



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

DANIELA PIMENTA NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA MUTAÇÃO E ANÁLISE DE SUA
SEGREGAÇÃO EM UMA FAMÍLIA COM EXOSTOSE MÚLTIPLA HEREDITÁRIA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de bacharel em Biomedicina, sob orientação da professora. Dra Anabele Azevedo Lima.

BRASÍLIA

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora do UniCEUB, professora Dra. Anabele Azevedo Lima, mestra e doutora em patologia molecular pela UNB e professora de biofísica do curso de Biomedicina do UniCEUB, pelo seu profissionalismo e por toda a ajuda, sugestões, carinho, orientação e companherismo.

Agradeço ao professor da iniciação científica, Dr Robert Pogue, professor de genética da graduação e orientador do programa da Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília e a mestra Cristina Medina por terem me auxiliado na execução do tema e cedido as imagens da tese de mestrado para o meu trabalho de conclusão de curso, bem como, os agradeço por todo o carinho, paciência e disponibilidade em me auxiliar.

O professor Dr. Robert Pogue e a professora Dra. Anabele Azevedo Lima são para mim um espelho da profissional que eu quero ser. Sei que sozinha, sem a ajuda de cada um deles, nada teria acontecido. Por isso, o meu muito obrigada!

Identificação molecular da mutação e análise de sua segregação em uma família com Exostose Múltipla Hereditária

Daniela Pimenta Nascimento¹
Anabele Azevedo Lima²

RESUMO

A Exostose Múltipla Hereditária (EMH) é uma doença esquelética autossômica dominante caracterizada por tumores ósseos benignos recobertos por tecido cartilaginoso (exostoses), os quais se localizam principalmente nas regiões metafisiárias dos ossos longos. A idade média diagnosticada é aos três anos e a incidência é de 1:50.000 habitantes. Mutações nos genes *EXT1* e *EXT2*, genes supressores tumorais, estão envolvidas com a etiologia da doença. O objetivo da pesquisa foi caracterizar molecularmente uma família com diagnóstico clínico e radiológico de EMH, por meio do sequenciamento de alto desempenho e posteriormente, verificar a segregação da mutação identificada na família. Desta forma, foi identificada uma variante em heterozigose no gene *EXT1*, tratando-se de uma nova variante classificada como mutação *nonsense* e, provavelmente, patogênica. Este achado permite o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-implantacional, evitando assim, que a próxima geração apresente o risco de desenvolver a doença.

Palavras-chave: Gene *EXT1*; protuberâncias ósseas; exostoses; diagnóstico pré-implantacional.

Molecular identification of the mutation and analysis of the segregation in a family with Multiple Hereditary Exostoses

ABSTRACT

Multiple Hereditary Exostoses (MHE) is an autosomal dominant skeletal disease characterized by benign bone tumours covered by cartilaginous tissue (exostoses). These tumours are located mainly in the metaphysis of long bones. The average age diagnosed is three years and the incidence is 1:50.000 in the population. Mutations in the genes *EXT1* and *EXT2*, tumour suppressor genes, are involved in the etiology of the disease. The aim of the study was to characterize a family with a clinical and radiology diagnosis of HME by means of high performance sequencing and later to verify the segregation of the mutation identified in the family. A variant in heterozigose was identify in the *EXT1* gene. It's a new variant classified as nonsense mutation and probably, it's a pathogenic mutation. This finding allows for genetic counseling and pre implantation diagnosis, avoiding that the next generation develop the disease.

Keywords: Gene *EXT1*; bone pretuberances; exostoses; pre-implantation diagnosis.

¹ Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília - UniCEUB.

² Graduada em Ciências Biológicas pelo UniCEUB. Mestrado e Doutorado em Patologia Molecular pela UNB. Professora de biofísica do curso de Biomedicina do UniCEUB.

1. INTRODUÇÃO

Osteocondromas são projeções ósseas recobertas por tecido cartilaginoso, os quais se elevam na superfície externa do osso (SERAFINI et al., 2013; SOUZA; JÚNIOR, 2014). Apesar da composição óssea ser predominante, seu crescimento ocorre na porção cartilaginosa. Apresentam-se sob duas formas clínicas distintas: lesão única (Osteocondroma Solitário, Exostoses Osteocartilaginosas) ou diversas lesões (Osteocondromas Múltiplos, Exostose Múltipla Hereditária) (SOUZA; JÚNIOR, 2014).

A Exostose Múltipla Hereditária (EMH) é uma anomalia no desenvolvimento ósseo, em que há a formação de protuberâncias ósseas de várias dimensões, principalmente nas regiões metafisárias dos ossos longos (GRAY; DEVERSA, 2008; JONES, 2011), revestidas por uma capa de cartilagem hialina (JONES, 2011). Ocorrem também na região metafisária do tronco, escápula e íleo (ASSEFA et al., 2011). Podem estar associadas a distúrbios no crescimento, como por exemplo, redução da estatura (STAAL et al., 2015) e ao encurvamento do antebraço (HAM et al., 2016).

Trata-se de uma doença com grande variabilidade clínica, inclusive dentro da própria família (intrafamiliar), podendo ser diagnosticada a partir dos 3 anos de idade. Estudos radiológicos confirmam esta variação clínica (BOVÉE, 2008; PORTER et al., 2004; WUYTS et al., 2013). Sua prevalência estimada é de 1 caso em 50.000 habitantes (1:50.000) na população ocidental (BOVEÉ, 2008) e aproximadamente 62% dos pacientes diagnosticados com Osteocondromas Múltiplos têm histórico familiar positivo para a doença (HAMEETMAN et al., 2004).

As protuberâncias ósseas associadas a EMH são tumores benignos denominados exostoses que se formam adjacentes às placas dos ossos longos, costelas e pelve (ZHUANG et al., 2016). Devido ao seu tamanho e localização, os tumores podem causar vários problemas à saúde, incluindo, retardo e deformidades do crescimento esquelético, dor crônica e compressão neurovascular (HUEGEL et al., 2015; JONES, 2011).

O aparecimento dos tumores normalmente é simétrico e envolve principalmente o fêmur, tíbia, fibula, rádio e a ulna. Deformidades em mãos resultantes de metacarpos encurtados são comuns e o remodelamento ósseo anormal pode resultar no encurtamento e encurvamento desses ossos e em metáfises alargadas (PORTER et al., 2004).

Uma das complicações do osteocondroma relatada na literatura é a possível degeneração maligna com evolução para um condrossarcoma. Os sinais clínicos do

condrossarcoma são: aumento do tamanho do tumor e muita dor. São tipicamente encontrados em pacientes da terceira idade, sendo raros em crianças e adolescentes (BOVÉE, 2008). E o risco da progressão maligna é de 0 a 5% em pacientes com Exostose Múltipla Hereditária (MHE) (SCHMALE et al., 2010).

Outras complicações da EMH são a ocorrência de um enorme osteocondroma costal (LIU et al., 2013) e a formação de exostoses na superfície das vértebras. Estas podem comprimir a medula espinhal e as raízes nervosas (BARI et al., 2009). As exostoses podem também comprimir o esôfago, resultando em dificuldades de deglutição e se ocorrerem nas superfícies costais podem causar hemotórax ou pneumotórax espontâneos, sendo necessária a intervenção cirúrgica (ASSEFA et al., 2011).

Atualmente, não há tratamento para essa anomalia óssea quando não traz repercussões clínicas (WUYTS et al., 2013). A intervenção cirúrgica que é a retirada completa do tumor, torna-se necessária se as exostoses estão causando dor (DARILEK et al., 2005), deformidades ósseas (PORTER et al., 2004), anormalidades de crescimento (TRIVEDI et al., 2016), compressão neurovascular (BELTRAMI et al., 2016) e outras complicações da doença, como por exemplo, estenoses (TRIVEDI et al., 2016) e compressão da medula espinhal (FILHO et al., 2006).

A EMH é uma doença geneticamente heterogênea, transmitida por uma herança autossômica dominante com penetrância completa e expressividade variável (FILHO et al., 1983; GRAY; DEVERSA, 2008). Estudos recentes revelaram que os genes *EXT1* e *EXT2* estão envolvidos em sua etiologia (COUSMINER et al., 2016). O gene *EXT1* está localizado no *locus* 8q24.1, estende-se por aproximadamente 350kb e é formado por 11 éxons (LUDECKE et al., 1997). Enquanto que o gene *EXT2* está localizado no *locus* 11p11, estende-se por quase 108kb e é formado por 16 éxons (CLINES et al., 1997). Ambos são genes supressores tumorais e estão envolvidos na síntese de heparan sulfato (BUSSE et al., 2007).

Mutações no gene *EXT1* correspondem a 56 – 78% dos casos de Osteocondromas Múltiplos. Enquanto que as do gene *EXT2* correspondem a cerca de 21 – 44% dos casos (JENNES et al., 2009). Aproximadamente 90% dos pacientes com Osteocondromas Múltiplos apresentam mutações germinativas. Vários relatos descreveram variações mutacionais nos genes *EXT1* e *EXT2* em pacientes com MHE em diversos países (ISHIMARU et al., 2016).

Recentemente, mais de 400 mutações foram identificadas no gene *EXT1* e 200 mutações foram identificadas no gene *EXT2*. Destas, a maioria eram mutações *nonsense* (mutações sem sentido), *frameshift* (mutações fora do quadro de leitura) e no sítio do *splicing*, resultando no término prematuro da proteína, em sua degradação ou na perda de sua função quase que completamente (ISHIMARU et al., 2016; XIA et al., 2015).

Diante desse cenário, apesar do diagnóstico da doença ser essencialmente clínico e radiológico, a identificação da mutação pelo painel *Trusight* de Câncer e sua confirmação pelo sequenciamento de Sanger permitem procedimentos de aconselhamento genético e reprodução assistida com diagnóstico pré implantacional, possibilitando que as mulheres afetadas gerem embriões que não apresentem a mutação evitando, assim, a transmissão da doença à prole.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar molecularmente uma família com diagnóstico clínico e radiológico de Exostose Múltipla Hereditária, por meio do sequenciamento de alto desempenho (painel *Trusight* de Câncer) e, posteriormente, verificar a segregação da mutação identificada na família.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Participantes da pesquisa

Esta pesquisa foi focada em uma família com 79 membros, dentre os quais, 22 são indivíduos afetados com EMH. Para este estudo, 9 indivíduos (7 indivíduos afetados e 2 controles) foram analisados molecularmente, conforme apresentado no heredograma (figura 1). A probanda (caso índice), descrita na caracterização dos sujeitos da pesquisa (ver item **2.3** da metodologia) foi o primeiro caso diagnosticado com a doença.

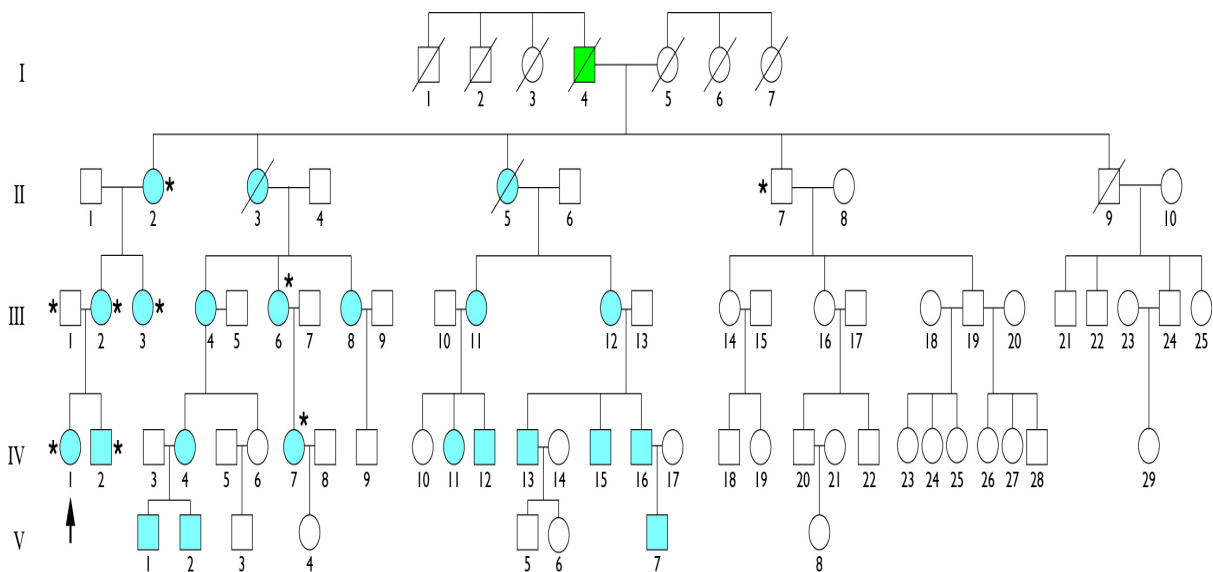
Foi realizada uma entrevista com a probanda para a obtenção de sua história familiar e, assim, a identificação de indivíduos potencialmente afetados com a doença, junto com os controles apropriados (membros da família não afetados. Membros da família que não têm mutações nos genes *EXT1* ou *EXT2*). Estes, uma vez disponíveis, foram recrutados para a avaliação clínica.

Após preencherem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), todos os indivíduos portadores da doença foram examinados no Hospital de Apoio (DF) por pelo menos dois médicos e submetidos a exames radiológicos, os quais confirmaram o diagnóstico

da doença. Por fim, para a caracterização molecular, foi realizado o sequenciamento pelo painel *Trusight* de Câncer para a identificação da mutação e esta foi confirmada pelo sequenciamento de Sanger. Esta etapa, a caracterização molecular, foi realizada no laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília Campus II.

É importante ressaltar que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Católica de Brasília Campus II, pelo número 056/11, em 25 de Abril de 2011. Quanto aos aspectos éticos, foi mantido total anonimato dos participantes e estes não foram expostos a qualquer tipo de discriminação ou constrangimento. Os resultados do diagnóstico e da pesquisa molecular foram entregues ao próprio participante. E a pesquisa poderia ser suspensa ou encerrada se algum participante retirasse o seu consentimento de participação.

Figura 1 – Heredograma da família com Exostose Múltipla Hereditária.



Legenda: A probanda (caso-índice) está identificada com uma seta. Indivíduos afetados em azul. Indivíduos que foram a óbito com um risco. Indivíduo em verde foi descrito como tendo baixa estatura, apesar de não ter sido analisado. Indivíduos que realizaram exame molecular foram identificados com asteriscos.

Fonte: Elaborado pela autora e pela Dra. Cristina Medina, médica geneticista do Hospital de Apoio (DF).

2.2 Critérios de inclusão e exclusão dos participantes

Foram inclusos na pesquisa os indivíduos da família da probanda, de ambos os sexos, com idades entre 29 a 80 anos e que concordaram em assinar o TCLE. Destes, sete indivíduos apresentavam fenótipo de Exostose Múltipla Hereditária (EMH). O diagnóstico foi confirmado pelo exame radiológico na presença de dois ou mais osteocondromas e foram coletadas amostras de sangue de dois indivíduos normais da família, servindo como controles

negativos, para a validação de uma eventual mutação. Os indivíduos excluídos da pesquisa foram os que não se disponibilizaram para a coleta de sangue.

2.3 Caracterização dos Sujeitos da Pesquisa

Os participantes da pesquisa foram submetidos a exame clínico e radiológico, conforme descrito na tese de mestrado da Dra. Cristina Medina, médica geneticista do Hospital de Apoio – DF e mestra do programa de Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília (Título da dissertação: Caracterização Molecular e Fenotípica de uma Família com Exostose Múltipla Hereditária. Autora: Cristina Touguinha Neves Medina. Ano: 2017).

Os exames clínico e radiológico não foram realizados pela autora mas por dois médicos do Hospital de Apoio, incluindo a médica geneticista Dra. Cristina Medina, e são fundamentais para a caracterização molecular da doença. Desta forma, a descrição relatada neste tópico constitui dados prévios e relevantes para a obtenção dos resultados.

A probanda (IV.1 - ver heredograma, figura 1 do item 2.1 da metodologia) foi o primeiro caso diagnosticado. É uma mulher de 32 anos com desenvolvimento neuropsicomotor adequado. Aos 17 anos foi submetida a intervenção cirúrgica para a retirada de uma exostose na região proximal do úmero esquerdo.

Seu exame físico revelou deformidade no antebraço esquerdo, múltiplas projeções ósseas nos dedos das mãos e dos pés (figura 2), no joelho e no tornozelo direito. Sua avaliação radiológica evidenciou vários osteocondromas nas regiões ulnar e radial distais (figura 3), proximal da fibula e tíbia direitas, bem como na região distal do fêmur direito (figura 4).

As alterações clínicas e radiológicas observadas nos demais indivíduos afetados (IV.2, IV.7, III.2, III.3, III.6, II.2) foram as seguintes:

Indivíduo IV.2: É um homem de 29 anos. Seu quadro clínico teve início aos 3 anos de idade e a partir dos 19 anos foi submetido a diversos procedimentos cirúrgicos, tanto pela deformidade e assimetria dos membros inferiores decorrentes dos osteocondromas, quanto pela exostose presente no úmero direito, que por comprimir o nervo causava parestesia do membro. Apresentava encurvamento do antebraço bilateral. As imagens radiográficas evidenciaram vários osteocondromas no fêmur, tíbia e fibula bilaterais (figura 5), úmero esquerdo, rádio, ulna e bacia.

Indivíduo IV.7: É uma mulher de 30 anos. Seu quadro clínico teve início aos 3 anos de idade e a partir dos 12 anos foi submetida a várias cirurgias em decorrência das exostoses. As imagens radiográficas evidenciaram exostoses na tíbia, fíbula, fêmur, rádio e ulna bilateralmente.

Indivíduo III.2: É uma mulher de 48 anos. Seu quadro clínico teve início aos 3 anos de idade e aos 14 anos foi submetida a uma cirurgia no antebraço direito. As radiografias evidenciaram exostoses nas regiões proximais e distais bilateralmente do fêmur, tíbia e fíbula. Também revelaram exostoses no úmero esquerdo, rádio, ulna, bacia (figura 6), arco costal e falanges.

Indivíduo III.3: É uma mulher de 50 anos. Seu quadro clínico teve início aos 15 anos e três meses depois foi submetida a uma intervenção cirúrgica, devido à compressão medular causada pelo osteocondroma na vértebra. As imagens radiológicas evidenciaram osteocondromas na tíbia, fíbula, fêmur, rádio, ulna e úmero bilateralmente (figura 7).

Indivíduo III.6: É uma mulher de 48 anos. Seu quadro clínico teve início na infância porém, não se sabe a idade exata. Não foi submetida a intervenção cirúrgica. As imagens radiográficas evidenciaram exostoses na fíbula direita, fêmur e tíbia bilateralmente.

Indivíduo II.2: É uma mulher de 80 anos. Seu quadro clínico teve início aos 3 anos de idade, porém não foi submetida a intervenção cirúrgica. As imagens radiológicas evidenciaram poucos osteocondromas nas regiões da tíbia, fíbula e úmero (figura 8).

Uma queixa constante entre os pacientes avaliados pelos médicos do Hospital de Apoio foi a dor, causada pelas exostoses, a qual variou de leve à incapacitante. A baixa estatura estava presente nos indivíduos IV.1, III.2, III.3 e II.2 e nenhum indivíduo reportou o aparecimento de novos tumores após a puberdade.

Não se sabe ao certo o quadro clínico dos indivíduos I.4 e I.5. Apenas sabe-se que o primeiro, indivíduo I.4, apresentava baixa estatura e o segundo, indivíduo I.5, não apresentava alterações fenotípicas. Na família da probanda, não houve relato de degeneração maligna do osteocondroma em condrossarcoma. Os quadros a seguir (quadro 1 e 2) exemplificam a clínica e o quadro radiológico dos participantes da pesquisa.

Quadro 1 – Apresentação clínica dos indivíduos com diagnóstico de Exostose Múltipla Hereditária

Indivíduos	IV.1	IV.2	IV.7	III.2	III.3	III.6	II.2
Sexo	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino
Idade	32 anos	29 anos	30 anos	48 anos	50 anos	48 anos	80 anos
Início dos Sintomas	3 anos	3 anos	3 anos	3 anos	15 anos	Não Relatado	3 anos
Exostoses	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Cirurgia	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Idade da Cirurgia	17 anos	19 anos	12 anos	14 anos	15 anos	-	-
Encurvamento do Antebraço	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não
Baixa Estatura	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim
Dor	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não

Fonte: Elaborado pela autora

Quadro 2 – Localização das exostoses nos Indivíduos diagnosticados com Exostose Múltipla Hereditária.

Indivíduos	IV.1	IV.2	IV.7	III.2	III.3	III.6	II.2
Sexo	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino
Idade	32 anos	29 anos	30 anos	48 anos	50 anos	48 anos	80 anos
Exostoses em Ossos Longos	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim Poucas
Onde?	Ulna Rádio Fíbula direita Tíbia direita Fêmur direito	Fêmur bilateral Tíbia bilateral Fíbula bilateral Úmero esquerdo Rádio Ulna	Tíbia bilateral Fíbula bilateral Fêmur bilateral Rádio bilateral Ulna bilateral	Fêmur Tíbia Fíbula Úmero esquerdo Rádio Ulna Falanges Arco costal	Tíbia Fíbula Fêmur Rádio Ulna Úmero bilateral	Fíbula direita Fêmur bilateral Tíbia bilateral	Tíbia Fíbula Úmero
Exostoses em Ossos Chatos	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não

Onde?	-	Bacia	-	Bacia	-	-	-
--------------	---	-------	---	-------	---	---	---

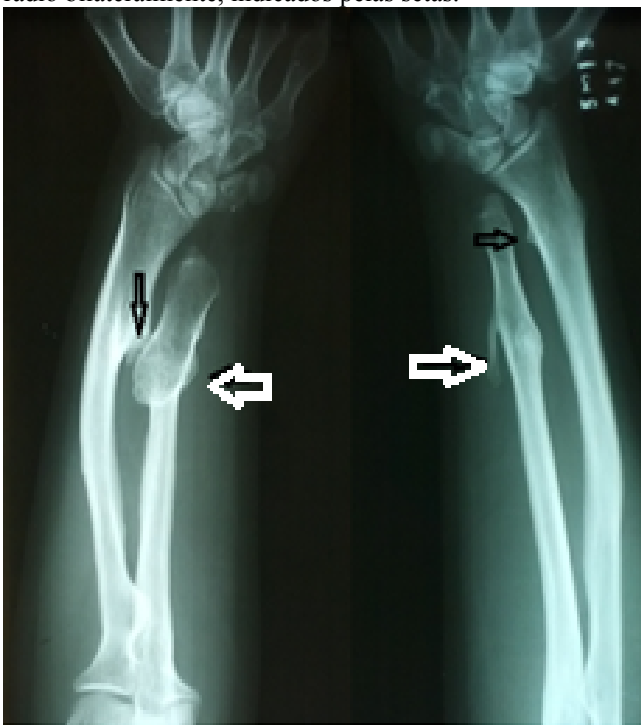
Fonte: Elaborado pela autora

Figura 2 – Foto da probanda. Exostose no segundo dedo esquerdo do pé, indicado pela seta.



Fonte: Cedido pela Dra. Cristina Medina, médica geneticista do Hospital de Apoio (DF).

Figura 3 - Radiografia de membros superiores da probanda mostrando a presença de osteocondromas na ulna e rádio bilateralmente, indicados pelas setas.



Fonte: Cedido pela Dra. Cristina Medina, médica geneticista do Hospital de Apoio (DF).

Figura 4 – Radiografia da perna direita (figura A) e do joelho direito (figura B) da probanda mostrando a presença de osteocondromas nas regiões da tíbia, fêmur e fíbula, indicados pelas setas.



Fonte: Cedido pela Dra. Cristina Medina, médica geneticista do Hospital de Apoio (DF).

Figura 5: Radiografias do indivíduo IV. 2 Osteocondromas na perna esquerda, indicados pelas setas.



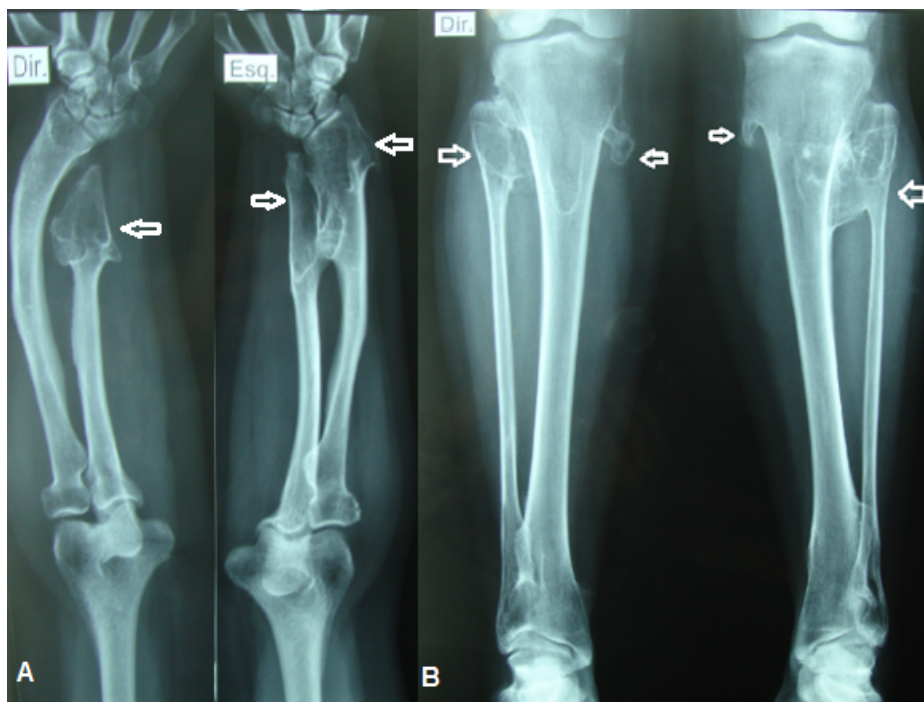
Fonte: Cedido pela Dra. Cristina Medina, médica geneticista do Hospital de Apoio (DF).

Figura 6: Radiografias do indivíduo III. 2 Osteocondromas na bacia, indicados pelas seta.



Fonte: Cedido pela Dra. Cristina Medina, médica geneticista do Hospital de Apoio (DF).

Figura 7: Radiografias do indivíduo III. 3. Osteocondromas nos antebraços (letra A) e pernas (letra B) bilateralmente, indicados pelas setas.



Fonte: Cedido pela Dra. Cristina Medina, médica geneticista do Hospital de Apoio (DF).

Figura 8: Radiografias do indivíduo II.2. Osteocondroma no úmero esquerdo, indicado pela seta.



Fonte: Cedido pela Dra. Cristina Medina, médica geneticista do Hospital de Apoio (DF).

2.4 Caracterização Molecular

2.4.1 Sequenciamento de Alto Desempenho - Painel *Trusight* de Câncer

O DNA da probanda, de seus pais e de 21 indivíduos controles foi sequenciado pelo painel *Trusight* de Câncer, devido a sua disponibilidade no laboratório e por nele constarem os genes *EXT1* e *EXT2*. O painel inclui 94 genes suspeitos relacionados à predisposição ao câncer e 284 SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único).

A preparação das bibliotecas de DNA foi realizada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante (“TruSight Enrichment DNA Sample Preparation Guide illumina”) e o sequenciamento foi realizado na plataforma *MiSeq illumina*, também de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (“MiSeq System Guide illumina”).

Os dados obtidos pelo sequenciamento foram analisados pelo programa *BaseSpace* da *illumina*. O alinhamento foi realizado pelo aplicativo *TruSeq Amplicon* e a filtragem das

variantes foi realizada pelo *illumina Variant Studio*. Foram priorizadas as variantes visualizadas em uma paciente, sendo estas raras ou desconhecidas na população geral e que tinham previsão de serem patológicas com base nos programas *Mutation Taster*, *Polyphen* e *SIFT II*. Para determinar a frequência populacional das variantes, estas foram pesquisadas nos bancos de dados *dbSNP*, *ExAC* e *Multiple Osteochondromas Mutation Database (MOdb)*. Uma vez identificados os genes, a mutação foi confirmada pelo sequenciamento pelo método de Sanger.

2.4.2 Sequenciamento por Sanger

O DNA genômico dos pacientes afetados e dos controles foi extraído a partir do sangue venoso periférico, por meio do kit para extração de DNA e segundo o protocolo fornecido pelo fabricante (“Kit DNA Blood Mini – Qiagen”). A qualidade das amostras de DNA extraídas foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Para a amplificação do gene *EXT1* na região flanqueando a mutação, os oligonucleotídeos foram desenhados usando o programa Primer3 (primer3.ut.ee). As sequências dos oligonucleotídeos foram: Forward: 5'-atggccgctagaatgttttg-3'; Reverse: 5'-tccttgggatcaattgaaa-3'.

Esses oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar um produto de 216 pares de bases (pb) do gene *EXT1*. A temperatura de anelamento foi 58°C. E os produtos de PCR foram purificados com as enzimas ExoSTAR (Exonuclease I e Shrimp alkaline phosphatase) para a remoção dos primers e dos desoxinucleotídeos (dNTPs) e quantificados pelo espectrofotômetro Qubit (Invitrogen®). Posteriormente, estes produtos (10ng) foram sequenciados em ambas as direções (reto-Forward e reverso-Reverse) usando o reagente BigDye v.3.0 (Thermo Fisher) no aparelho ABI 3130 (Life Technologies), segundo o método de Sanger. As sequências obtidas foram, então, analisadas pelo programa Chromas (ChromasPro DNA Sequencing).

3. RESULTADOS

Uma variante em heterozigose foi identificada no gene *EXT1* da probanda (IV.1 - afetada) e em sua mãe (III.2 - afetada) pelo sequenciamento pelo painel *Trusight* de Câncer (figura 9). Não foi identificada nenhuma mutação no DNA do pai (III.1 - normal). No painel de genes, a probanda teve 135 variantes de nucleotídeo único: 79 sinônimas e 56 não

sinônimas, com uma cobertura de 75X para a probanda, 80X para a mãe e 77X para o pai. Entre as variantes encontradas, nenhuma variante potencialmente patogênica foi detectada no gene *EXT2*.

A mutação no gene *EXT1* é classificada como sem sentido (nonsense), descrita como c.289A>T; p. K97X que codifica um *stop codon* prematuro (códon de terminação prematuro). Esse códon prematuro pode resultar na terminação precoce da síntese da proteína EXT1, com a produção de uma proteína não funcional. Porém, não se pode afirmar que haverá a produção de uma proteína não funcional, já que estudos funcionais não foram realizados. A mutação também não foi encontrada nos bancos de dados *Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)*, *Exome Aggregation Consortium (ExAC)* e *Multiple Osteochondromas Mutation Database (MOdb)*. Trata-se, portanto, de uma mutação nova.

Essa mutação, presente no DNA da probanda e da mãe, foi confirmada pelo sequenciamento de Sanger (figura 10). Também foi constatada a mutação nos demais indivíduos afetados da família (IV.2, IV.7, III.2, III.3, III.6, II.2) mas, não nos controles negativos (indivíduos normais: III.1 e II.7).

Figura 9– Sequenciamento pelo painel *Trusight* de Câncer do DNA da probanda (indivíduo IV.1 - afetada).

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Classification	Type	Gen...	Exonic	Filters	Quality	GQX	Inherited From	Alt Variant Freq	Read Depth	Alt Read Depth	Allelic Depths	Num Transcripts	Transcript	Consequence	cDNA Position	Allele Freq	CDS Position
EXT1	C>T/T	8	118819578	...	snv	hom	yes	PASS	54700	114		100	39	39	0,39	1	NM_000127.2	synonymous_variant	2534	37,00	1761
EXT1	G>A/A	8	118847782	...	snv	hom	yes	PASS	32400	60		100	21	21	0,21	1	NM_000127.2	synonymous_variant	1838	19,00	1065
EXT1	T>T/A	8	119122997	Presumed Pathogenic	snv	het	yes	PASS	19400	194		48,78	41	20	21,20	1	NM_000127.2	stop_gained	1062	0,00	289

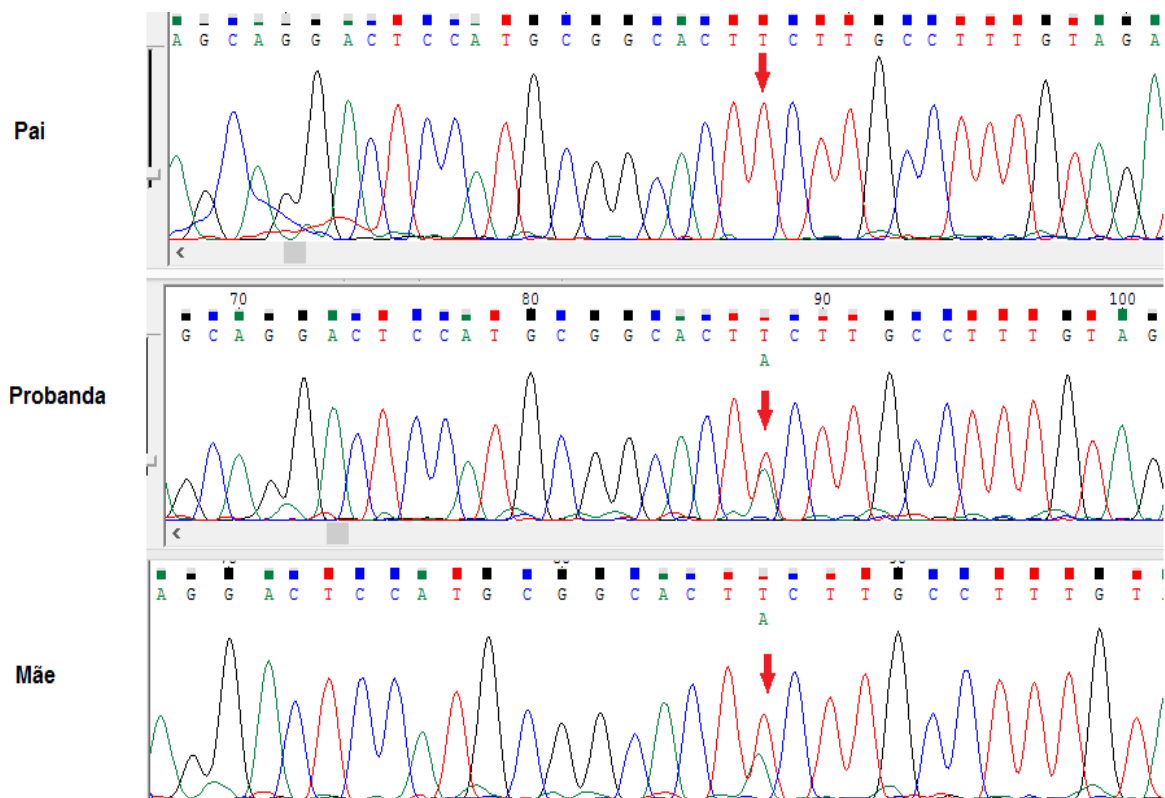
- 1 - Nome do gene.
- 2 - Variante.
- 3 - Previsão de patogenicidade pelos algoritmos.
- 4 - Zigosidade.
- 5 - Proporções dos alelos, confirmando zigosidade.

- 6 - Consequência da variante.
- 7 - Frequência da variante na população normal.
- 8 - Posição da variante na sequência codante.

Legenda: Foi identificada uma variante em heterozigose no gene *EXT1* da probanda (caso-índice). No painel de genes, a probanda teve 135 variantes de nucleotídeo único: 79 sinônimas e 56 não sinônimas, com uma cobertura de 75X.

Fonte: Cedido pela Dra. Cristina Medina, médica geneticista do Hospital de Apoio (DF).

Figura 10 – Eletroferograma do sequenciamento de Sanger para confirmação da mutação. A fita presente foi a complementar.



Fonte: Elaborado pela autora.

4. DISCUSSÃO

A Exostose Múltipla Hereditária (EMH) ou Osteocondromas Múltiplos (SOUZA; JÚNIOR, 2014) é uma doença esquelética transmitida por uma herança autossômica dominante com expressividade variável, inclusive no nível intrafamiliar (BOVEÉ, 2008), e penetrância completa (FILHO et al., 1983). Mutações nos genes *EXT1* e *EXT2* estão associadas com a etiologia da doença (COUSMINER et al., 2016; ISHIMARU et al., 2016).

A doença esquelética se caracteriza pela formação de protuberâncias ósseas, de várias dimensões, principalmente na metáfise dos ossos longos, revestidas por cartilagem hialina (JONES, 2011). Seu quadro patológico pode estar associado com a redução da estatura

(STAAL et al., 2015), encurvamento do antebraço (HAM et al., 2016), deformidades esqueléticas, como a escoliose, e a assimetria dos membros (SOLOMON, 1964). A idade média diagnosticada é aos 3 anos de idade (PORTER et al., 2004).

Clinicamente, devido ao tamanho e localização das exostoses, estas podem causar dor crônica e compressão dos nervos e vasos sanguíneos nos pacientes. No entanto, casos como degeneração maligna do osteocondroma em condrossarcoma (BOVÉE, 2008), enorme osteocondroma costal (LIU et al., 2013) e compressão da medula espinhal, raízes nervosas (BARI et al., 2009) e do esôfago (ASSEFA et al., 2011) já foram relatados na literatura. Nesses casos, em que há a dor crônica, torna-se necessária a intervenção cirúrgica (DARILEK et al., 2005).

O presente trabalho buscou caracterizar molecularmente uma família com diagnóstico clínico e radiológico de EMH, por meio do sequenciamento de alto desempenho e, posteriormente, verificar a segregação da mutação identificada na família a partir da análise do DNA dos indivíduos afetados (n=7) e controles (n=2), para averiguar se esta variante segrega como o esperado para o fenótipo da doença. Também comparou o diagnóstico clínico e radiológico dos indivíduos em estudo com os resultados obtidos pela caracterização molecular.

Em concordância com a literatura, a maioria dos indivíduos afetados da família apresentou início dos sintomas aos 3 anos de idade e as protuberâncias ósseas estavam presentes principalmente na metáfise dos ossos longos dos indivíduos analisados clinicamente e pela radiografia. Os indivíduos IV.1, IV.2 e III.2 apresentaram dor e encurvamento do antebraço. A baixa estatura foi perceptível nos indivíduos IV.1, III.2, III.3 e II.2 e os indivíduos IV.1, IV.2, IV.7, III.2 e III.3 foram submetidos à intervenção cirúrgica. Não houve relato de degeneração maligna do osteocondroma em condrossarcoma nos indivíduos avaliados. A apresentação clínica dos indivíduos afetados da família pode ser exemplificada no quadro 3.

Quanto à caracterização molecular, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para a amplificação e sequenciamento da parte do gene *EXT1*, onde a mutação foi identificada pelo sequenciamento pelo Painel *Trusight* de Câncer. Os resultados do sequenciamento pelo método de Sanger revelaram que a mesma variante estava presente em heterozigose no gene *EXT1* nas quatro gerações dos indivíduos afetados da família. A mutação foi encontrada em todos os indivíduos afetados que foram analisados porém, não estava presente nos indivíduos

normais. A constatação acima fortalece a hipótese de que essa variante pode ser a causadora da doença.

A variante é uma mutação *nonsense* (mutação sem sentido), caracterizada pela substituição da adenina pela timina no nucleotídeo 289. Está localizada no primeiro éxon do gene *EXT1*, no domínio exostosin, codificando um *stop codon* prematuro (códon de terminação prematuro). Esse códon prematuro pode gerar, conseqüentemente, o término precoce da síntese proteica com a perda de grande parte da proteína e de seus domínios. Desta forma, a proteína produzida a partir do alelo seria prevista a não funcionar.

No entanto, é provável que o mRNA seja degradado pelo mecanismo *nonsense mediated decay* (degradação mediada por mutação sem sentido), de forma que, com a eliminação dos transcritos de mRNA que contém os códons de parada prematuros, não haverá a tradução dos transcritos em proteínas (HUG; LONGMAN; CÁCERES, 2016; KARAM et al., 2013). Porém, para a confirmação desse mecanismo, seria necessária a realização de análises funcionais para avaliar a expressão gênica da amostra isolada do osteocondroma, como por exemplo, a realização do qPCR (PCR em tempo real).

Segundo dados da literatura, mais de 400 mutações foram identificadas até o presente momento no gene *EXT1*. Destas, a maioria são mutações *nonsense* (24%), *frameshift* (44%) e no sítio do *splicing* (11%) (ZHUANG et al., 2016). A mutação, mutação *nonsense*, identificada e confirmada na probanda e nos demais indivíduos afetados da família, é uma mutação nova por não ter sido encontrada nos bancos de dados dbSNP, ExAC, os quais contém dados descrevendo variantes genéticas em indivíduos normais, nem no MObd. Logo, esta foi a primeira descrição da variante. A variante está presente nos indivíduos afetados mas não nos indivíduos controles (III.1 e II.7: indivíduos normais) e, os algoritmos *Mutation Taster*, *scale invariant feature transform* (SIFT) e *PolyPhen*, algoritmos relacionados ao câncer, sugerem que esta mutação seja patogênica. Não foi detectada nenhuma variante potencialmente patogênica no gene *EXT2*.

Dessa forma, os dados sugerem fortemente que esta variante potencialmente patogênica seja a responsável pelos casos de EMH na família, porém, torna-se necessária, a realização de estudos funcionais para a sua confirmação. Os resultados moleculares confirmam que a mutação no gene *EXT1* segrega como o esperado para o fenótipo da doença, conforme proposto no objetivo da pesquisa.

Quadro 3 – Apresentação clínica dos indivíduos com diagnóstico de Exostose Múltipla Hereditária.

Indivíduos	IV.1	IV.2	IV.7	III.2	III.3	III.6	II.2	literatura
Idade (anos)	32	29	30	48	50	48	80	-
Início dos sintomas (anos)	3	3	3	3	15	NR	3	3
Fêmur	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Tíbia	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Fíbula	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Úmero	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Exostose na bacia	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Pouco observado
Exostose em falanges	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Raro
Exostose vertebral	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Raro
Encurvamento de antebraço	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim
Baixa estatura	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Dor	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Cirurgia/ anos	Sim/17	Sim/19	Sim/12	Sim/14	Sim/15	Não	Não	Sim
Malignidade	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	0,5-5%

Fonte: Elaborado pela autora.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi identificada uma variante em heterozigose no gene *EXT1*, presente em quatro gerações dos indivíduos afetados da família analisada. Trata-se de uma mutação *nonsense* (mutação sem sentido) descrita como c.289 A>T, p.K97x, a qual localiza-se no primeiro éxon do gene *EXT1* no domínio exostosin. A mutação foi encontrada em todos os indivíduos afetados analisados, mas não nos indivíduos normais, o que fortalece a hipótese de que essa variante é a causadora da doença e de que a mutação segrega como o esperado para o fenótipo da doença na família.

A variante é uma mutação nova, por não ter sido encontrada nos bancos de dados dbSNP, ExAC e MObd e há indícios de que seja patogênica. Apesar de ser uma doença em que o diagnóstico é essencialmente clínico e radiológico, a identificação da mutação por sequenciamento pelo Painel *Trusight* de Câncer e a sua confirmação pelo método de Sanger permitem procedimentos de aconselhamento genético e reprodução assistida com diagnóstico pré implantacional, evitando, assim, que a próxima geração apresente o risco de desenvolver a doença.

Quanto à perspectiva futura, há a intenção da coleta do sangue venoso periférico dos indivíduos afetados da família, para a verificação do mecanismo *nonsense mediated decay* (degradação mediada por mutação sem sentido), por meio do isolamento do RNA. Após o isolamento do RNA, as amostras de RNA serão convertidas em cDNA (DNA complementar) pela técnica RT-PCR (reação de transcriptase reversa) e então, será realizado o qPCR (PCR em tempo real) para a avaliação da expressão gênica da amostra isolada do osteocondroma de cada indivíduo afetado da família.

6. REFERÊNCIAS

- ASSEFA, D. et al. Three Faces of Costal Exostoses. Case Series and Review of Literature. **Pediatric Emergency Care**, Morristown, v. 27, n. 12, p. 1188-1191, dec. 2011.
- BARI, M. S. et al. Hereditary Multiple Exostoses Causing Cord Compression. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, Sylhet, v. 22, n. 12, p. 797-799, dec. 2009.
- BELTRAMI, G. et al. Hereditary Multiple Exostoses: a Review of Clinical Appearance and Metabolic Pattern. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, Firenze, v. 14, n. 3, p. 110-118, maio./ago. 2016.
- BUSSE, M. et al. Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to Heparan Sulfate Chain Elongation. **JBC Papers in Press. The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 282, n. 45, p. 32801-32809, nov. 2007.
- BOVÉE, J. VMG. Multiple Osteochondromas. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, Leiden, v. 3, n. 3, p. 1-7, feb. 2008.
- CLINES, G. A. et al. The Structure of the Human Multiple Exostose 2 Gene and Characterization of Homologs in Mouse and Caenorhabditis elegans. **Genome Research**, Dalas, v. 7, n. 4, p. 359-367, apr. 1997.
- COUSMINER, D. L. et al. Assessing the General Population Frequency of Rare Coding Variants in the EXT1 and EXT2 Genes Previously Implicated in Hereditary Multiple Exostoses. **Bone**, Minnesota, v. 92, p. 196-200, nov. 2016.
- DARILEK, S. et al. Hereditary Multiple Exostosis and Pain. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, Texas, v. 25, n. 3, p. 369-376, maio./jun. 2005.
- FILHO, J. L. et al. Exostose Múltipla Hereditária. Estudo de Oito Genealogias. **Medicina e Cultura**, São Paulo, v. 35, n.1, p. 1-38, jan./apr. 1983.
- FILHO, M. G. et al. Cervical Spinal Cord Compression due to an Osteochondroma in Hereditary Multiple Exostosis: Case Report and Review of the Literature. **World Neurosurgery**, São Paulo, v. 66, p. S7-S11, nov. 2006.
- GRAY, E. R.; DEVERSA, R. Hereditary Multiple Exostoses. **Hospital Physician**, Tennessee, v.44, n. 11, nov. 2008.
- HAM, J. et al. Multiple Osteochondromas (MO) in the forearm: a 12-year-single-centre experience. **Strategies in Trauma and Limb Reconstruction**, Hamburg, v. 11, n. 3, p. 169-175, nov. 2016.

- HAMEETMAN, L. et al. Multiple Osteochondromas: Clinicopathological and Genetic Spectrum ad Suggestions for Clinical Management. **Journal of Medical Genetics**, Leiden, v. 2, n. 4, p. 161-173, nov. 2004.
- HUEGEL, J. et al. Heparanase Stimulates Chondrogenesis and Is Up-Regulated in Human Ectopic Cartilage. A Mechanism Possibly Involved in Hereditary Multiple Exostoses. **The American Journal of Pathology**, Chicago, v. 185, n. 6, p. 1676-1685, jun. 2015.
- HUG, N.; LONGMAN, D.; CÁRCERES, J. F. Mechanism and Regulation of the Nonsense-Mediated Decay Pathway. **Nucleic Acids Research**, Edinburgh, v. 44, n. 4, p. 1483-1495, feb. 2016.
- ISHIMARU, D. et al. Large-scale mutational analysis in the EXT1 and EXT2 genes for Japanese patients with multiple osteochondromas. **BioMed Central. The Open Access Publisher**, London, v. 17, p. 1-7, mar. 2016.
- JENNES, I. et al. Multiple Osteochondromas: Mutation Update and Description of the Multiple Osteochondromas Mutation Database (MOdb). **Human Genome Variation Society**. Antwerp, v. 30, n. 12, p. 1620-1627, dec. 2009.
- JONES, K. B. Glycobiology and the Growth Plate: Current Concepts in Multiple Hereditary Exostoses. **Journal of Pediatric Orthopaedics**. Michigan, v. 31, n. 5, p. 577-586, jul./aug. 2011.
- KARAM, R. et al. Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: Implications for physiology and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, San Diego, v. 1829, n. 6-7, p. 624-633, jun./jul. 2013.
- LIU, W. et al. Giant Costal Osteochondroma in a Man With Multiple Exostoses. **The Annals of Thoracic Surgery**, St Louis, v. 96, n. 2, p. 675-677, aug. 2013.
- LUDECKE, H. J. et al. Genomic Organization and Promoter Structure of the Human EXT1 Gene. **Genomics**, New Orleans, v. 40, p. 351-354, mar. 1997.
- PORTER, D.E. et al. Severity of disease and risk of malignant change in hereditary multiple exostoses. A Genotype-phenotype study. **The Bone & Joint Journal**, London, v. 86-B, n. 7, p. 1041-1045, sep. 2004.
- SCHMALE, G. et al. Malignant Progressin in Two Children with Multiple Osteochondroma. **Sarcoma**, Seattle, v. 7, n.3, p.1-7, mar. 2010.
- SERAFINI, O. et al. Osteocondroma de colo posterior do fêmur. Posterior femoral neck osteochondroma. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 57, n. 1, p. 53-55, jan./mar. 2013.
- SOLOMON, L. Hereditary Multiple Exostosis. **American Journal of Human Genetics**, London, v. 16, n. 3, p. 351-363, sep. 1964.
- SOUZA, A. M. G.; JÚNIOR, R. Z. B. Osteocondroma: ignorar ou investigar? **Revista**

Brasileira de Ortopedia, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 555-564, sep. 2014.

STAAL, H. M. et al. Skeletal maturity of children with multiple osteochondromas: is diminished stature due to a systemic influence? **Journal of Children's Orthopaedics**, Amsterdam, v. 9, n. 5, p. 397-402, oct. 2015.

TRIVEDI, H. et al. Multiple hereditary exostosis: A pseudoaneurysm masquerading as tumor. **The Journal of Radiology Case Reports**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. 50-59, aug. 2016.

XIA, P. et al. Identification of a novel frameshift mutation of the EXT2 gene in a family with multiple osteochondroma. **Oncology Letters. Spandidos Publications**, Changchun, v. 11, n. 1, p. 105-110, oct. 2015.

WUYTS, W. et al. Hereditary Multiple Osteochondroma. **GeneReviews**, Seattle, nov. 2013.

ZHUANG, L. et al. Deletion of exon 8 from the EXT1 gene causes multiple osteochondromas (MO) in a family with three affected members. **Springerplus**, Bern, v. 5, n. 71, p. 1-9, jan. 2016.