Beatriz Marinho de Paula Mariani

**Padronização das técnicas de PNA e PCR em
tempo real para detecção das mutações
ativadoras no *GNAS* na síndrome de McCune-
Albright**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Candida Barisson
Villares Fragoso

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mariani, Beatriz Marinho de Paula

Padronização de técnicas de PNA e PCR em tempo real para detecção das mutações ativadores no *GNAS* na síndrome de McCune-Albright / Beatriz Marinho de Paula Mariani. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Candida Barrison Villares Fragoso.

Descritores: 1.Síndrome de McCune-Albright 2.Mutação puntual 3.Subunidades alfa Gsde proteínas de ligação ao GTP

USP/FM/DBD-215/12

Dedicatória

À minha mãe:

Isabel Marinho de Paula, por me mostrar o amor e acreditar em mim, por estar ao meu lado e mais do que tudo, por ser minha mãe, obrigada!

Ao meu pai:

Valter Mariani, meu grande mestre. Sempre com muito carinho, paciência e um orgulho no olhar.

À Maria Galuzzi (*in Memoriam*), por ser mãe, amiga, companheira e tudo que eu precisava.

À Hilda Galuzzi, por todas as conversas, ensinamentos e por sempre cuidar de mim.

Ao meu irmão por estar sempre ao meu lado.

À minha família e amigos que considero uma coisa só, por me amarem e respeitarem todos os dias da minha vida.

Agradecimentos

Apresento agora meus agradecimentos aos que de alguma forma contribuíram para a feitura desta dissertação:

Profa. Dra. Maria Candida B. Villares Fragoso

Profa. Dra. Berenice Bilharinho Mendonça

Profa. Dra. Ana Claudia Latronico

Ericka B. Trarbach

Ana Elisa C. Billerbeck

Mariana F. A. Funari

Rodrigo A. Toledo

Antonio M. Lerário

Aline Zamboni Machado

Tamaya C. Ribeiro

Mirian Y. Nishi

Regina M. Martin

Luciani Carvalho

Luciana Pinto Brito

Instituto de Ortopedia do HCFMUSP

Margarth Dutra

José Henrique Eleutério

Cristina Rossi

Francinilda da S. P. Oliveira

Rosangele de P. Zamboni Santos

Ricardo Araujo

Cintia Tusset

Vinicius N. de Brito

Ivo Arnhold

Alexander Jorge

À todos do LIM 42

LISTA DE SIGLAS

MAS – McCune-Albright syndrome

gsp – G stimulatory protein

Gs – G estimulatória

GTP – Guanosina trifosfato

Gs α - G estimulatória, subunidade α

AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina

GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina

Na⁺ - íon de sódio

K⁺ - íon de potássio

Ca²⁺ - íon de cálcio

GPCR - G protein coupled receptor

GEF - guanosine nucleotide exchange factor

GDI - guanine nucleotide dissociation inhibitor

GAP - GTPase activating protein

RGS - reguladores da sinalização por proteína G

PKA - proteína cinase dependente de AMPc

ATP – trifosfato de adenosina

PNA - *Peptidic Nucleic Acids*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

PCR – Polimerase chain reaction

PNA – Peptidic nucleic acids

MGB - *Minor Groove Binder*

NFQ - *quencher* sem fluorescência

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Ct – ciclos threshold

Cm² – centímetros quadrados

dsDNA – DNA dupla fita

p.R201H – mutação de ponto no codon 201 que leva a troca de arginina por histidina

p.R201C - mutação de ponto no codon 201 que leva a troca de arginina por cisteína

p.R201S - mutação de ponto no codon 201 que leva a troca de arginina por serina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pigmentações do tipo café-com-leite. **A)** Lesão típica na face, peitoral e braço de uma criança de 5 anos com SMA e a tendência dessas lesões em se apresentarem em hemicorpo. **B)** Lesões são tipicamente encontradas ao redor da nuca e a cima das nádegas (flechas).....pg. 02

Figura 2 – A e B) Tomografia de fêmur proximal com aparência típica de vidro fosco. **C e D)** Tomografia de crânio de uma paciente com 10 e 40 anos de idade respectivamente, demonstrando características típicas de vidro fosco na fibrodysplasia óssea. **E – G)** Cintilografia óssea de pacientes com grau variado de eformidade ósseo da fibrodysplasia, podendo se apresentar na forma monostótica (em **F**) ou poliostótica (em **G**).....pg. 04

Figura 3 – Ocorrência de uma mutação esporádica em uma única célula (caracterizada pelo ponto brilhante) em algum estágio durante o início do desenvolvimento embriológico. Quando a mutação ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento, os tecidos oriundos das 3 camadas germinativas serão afetados. A partir dessa célula mutada, outras células afetadas irão se desenvolver, caracterizando o fenótipo da SMA.....pg. 07

Figura 4 - Ativação do receptor e início do ciclo GTP.....pg. 12

Figura 5 - Gs α : padrão de metilação e seus *splicing* alternativos formando transcritos que codificam várias proteínas, juntamente com transcritos não traduzidos.....pg. 14

Figura 6 - Mecanismo de funcionamento da sonda do PNA. Ligação da sonda ao alelo normal impedindo a sua amplificação.....pg. 23

Figura 7 - Eletroferograma do produto de PCR do *GNAS*. A) Sangue periférico de um indivíduo normal mostrando a amplificação do alelo normal (seta) B) Sangue periférico de um paciente com FD óssea isolada mostrando a

amplificação do alelo mutado para a mutação p.R201H (seta) C) Tecido ósseo de um paciente com FD óssea isolada mostrando a amplificação do alelo mutado para a mutação p.R201H (seta)..... pg. 26

Figura 8 - Eletroferograma do produto de PCR do *GNAS* do sangue periférico de um indivíduo normal.....pg. 27

Figura 9 - Curva de amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de tecido fibrodisplásico.....pg. 28

Figura 10 - Curva de amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um paciente com FD óssea isolada.....pg. 29

Figura 11 - Curva de amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um indivíduo normal.....pg. 30

Figura 12 - Curva de Amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um paciente controle para a mutação p.R201S.....pg. 31

Figura 13 - Curva de Amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um indivíduo normal.....pg. 31

Figura 14 - Curva de Amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um paciente controle para a mutação p.R201C.....pg. 32

Figura 15 - Curva de Amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um indivíduo normal.....pg. 32

Resumo

Mariani, BMP. Padronização das técnicas de PNA e PCR em tempo real para detecção das mutações ativadoras no *GNAS* na síndrome de McCune-Albright [dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012

A síndrome de McCune Albright (SMA) é uma doença genética não hereditária, com incidência estimada entre 1/100.000 e 1/1.000.000 casos/ano. A SMA caracteriza-se clinicamente pela tríade: displasia óssea fibrosa (FD), manchas cutâneas café-com-leite e hiperfunção endócrina tais como: síndrome de Cushing, pseudo-puberdade precoce, hipertireoidismo, acromegalia. O diagnóstico da SMA clássica é usualmente baseado no quadro clínico associado a dosagens hormonais e exames de imagem, principalmente cintilografia do esqueleto. No entanto, quadros atípicos e formas parciais muitas vezes dificultam o diagnóstico preciso da síndrome. O objetivo deste estudo foi padronizar dentre as técnicas de PNA (*peptide nucleic acid*) e PCT em Tempo Real, para a detecção de polimorfismos de base única (SNPs), a técnica mais sensível para a discriminação das mutações ativadoras da subunidade α da proteína G. Para este estudo foram selecionados 32 pacientes, 1 masculino e 31 femininos, com SMA, todos em seguimento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Como resultado positivo, apresentamos nesse trabalho pela primeira vez o uso do RT-PCR genotipagem na detecção das mutações ativadoras da

proteína G, em DNA extraído de tecidos afetados e em leucócitos de sangue periférico, sendo a técnica considerada sensível o suficiente para discriminar de forma simples e rápida as mutações ativadoras da PGs. Sugerimos nesse estudo o uso da técnica de discriminação alélica pelo sistema *Taqman*. Essa técnica possibilita a detecção destas mutações *gsp* no sangue periférico mesmo numa baixa porcentagem, uma vez que nem sempre o tecido afetado (gônada, osso, hipófise) é disponível.

Summary

Mariani, BMP. Standardization of the PNA and real time techniques for the detection of activating mutations in the *GNAS* in McCune-Albright syndrome [dissertation] São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2012

The McCune-Albright Syndrome (MAS) is a genetic disease, with incidence estimated at 1/100.000 and 1/1000000 cases per year. MAS is clinically characterized by the triad: bone fibrous dysplasia (FD) *café-au-lait* skin spots and endocrine hyperfunction, such as: precocious puberty (PP), Cushing's syndrome, hyperthyroidism and acromegaly. The diagnosis of MAS is originally based on clinical characteristics associated with hormonal and imaging studies. However, atypical and partial forms often hamper the accurate diagnosis of the syndrome. For this study we selected 32 patients, 1 male and 31 females, all being treated in Hospital das Clínicas, School of Medicine, University of São Paulo. As a positive result, we showed for the first time the use of Real Time PCR/genotyping for the detection of activating mutations of the stimulatory G protein, using blood leucocytes DNA. This technique was sensible and can bring fast results for the patient and the physician, making the diagnosis easier. Our study proposes the use of allelic discrimination by Taqman system, which can be used as a probe that allows the identification of specific genotypes. These techniques could help detect these mutations in peripheral blood when the affected tissue is not available.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1.0 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Síndrome de McCune-Albright.....	01
1.2 Características clínicas.....	03
1.3 Fisiopatologia.....	04
1.4 Receptores 7 Transmembrana.....	08
1.5 Proteína G e seus efetores.....	09
2.0 Gene <i>GNAS</i>	12
3.0 Mutações ativadoras associadas à síndrome de McCune-Albright....	14
4.0 Testes genéticos.....	15
5.0 Objetivos.....	18
6.0 Materiais e métodos.....	19
6.1 Casuística.....	19
6.2 Métodos.....	20
6.3 Biópsia de pele (mancha <i>café-au-lait</i>).....	20
6.4 Extração de DNA.....	21
7.0 Pesquisa de mutações.....	22
7.1 Sequenciamento pelo método de Sanger após clonagem.....	22
7.2 PNA.....	22
7.3 PCR em tempo real/genotipagem.....	24
8.0 Resultados.....	26
8.1 Sequenciamento pelo método de Sanger após clonagem.....	26
8.2 Sondas PNA.....	27
8.3 PCR em tempo real/genotipagem.....	28
9.0 Discussão.....	33
10.0 Conclusão.....	36
11.0 Anexo.....	37
12.0 Referências.....	38

1.0 Introdução

1.1. Síndrome de McCune-Albright

A síndrome de McCune Albright (SMA) é uma doença genética rara, com prevalência estimada entre 1/100.000 e 1/1.000.000 casos/ano. A SMA caracteriza-se clinicamente pela tríade: displasia fibrodysplasia óssea, manchas cutâneas café-com-leite e puberdade precoce independente de gonadotrofinas ⁹. Outros estados de hiperfunção endócrina tais como hipertireoidismo, acromegalia e síndrome de Cushing também podem ocorrer, entretanto em menor frequência ²⁻⁸. Alguns órgãos não endócrinos podem raramente estar acometidos em pacientes com a SMA, aumentando o risco de morbidade e mortalidade desta patologia. Estes órgãos incluem fígado, rim, baço, trato gastrointestinal e cérebro. As anormalidades cardíacas incluem cardiomegalia, e hipertrofia muscular associadas à morte súbita. Outras alterações mais raras são: hiperplasia do timo, pólipos gastrointestinais, pancreatite, câncer de mama e microcefalia ¹¹.

O quadro de puberdade precoce ocorre principalmente no sexo feminino e caracteriza-se por ser independente de gonadotrofinas de início na primeira infância. As manchas *café-au-lait* podem estar presentes ao nascimento ou logo depois, localizando-se em hemicorpo, não ultrapassando

a linha média (Figura 1). A fibrodysplasia óssea acomete principalmente o fêmur proximal e a base do crânio podendo ocorrer múltiplas fraturas principalmente na fase da infância e adolescência¹².

O diagnóstico da SMA clássica é usualmente baseado no quadro clínico associado a dosagens hormonais e exames de imagem, principalmente cintilografia do esqueleto. No entanto, quadros atípicos e formas parciais muitas vezes dificultam o diagnóstico preciso da síndrome. Atualmente, este diagnóstico diferencial é realizado pelas características clínicas ao diagnóstico bem como pela evolução dos pacientes. A fibrodysplasia óssea associada à pelo menos uma hiperfunção endócrina e/ou mancha café-com-leite caracterizam o diagnóstico clínico da SMA^{13, 14}.

Fonte: Dumitresco, 2008¹

Figura 1 - Pigmentações do tipo café-com-leite. **A)** Lesão típica na face, peitoral e braço de uma criança de 5 anos com SMA e a tendência dessas

lesões em se apresentarem em hemicorpo.**B)** Lesões são tipicamente encontradas ao redor da nuca e a cima das nádegas (flechas).

1.2 Características clínicas

Os sinais e sintomas relacionados à puberdade precoce e a fibrodisplasia óssea são as apresentações clínicas mais frequentes da SMA (Figura 1). A pseudo-puberdade precoce se apresenta principalmente no sexo feminino, ocorrendo um sangramento vaginal seguido do desenvolvimento de tecido mamário, acompanhado ou não da presença de pelos pubianos. Os ovários geralmente apresentam cistos de tamanhos variáveis sendo raramente indicado o tratamento cirúrgico dos mesmos. Nos meninos sua apresentação é rara e geralmente ocorre um aumento testicular (que pode ser uni ou bilateral) associado à macrogenitossomia e adrenarca ⁶.

O acometimento da fibrodisplasia óssea no esqueleto apendicular geralmente reflete o deambular com dor, ou a presença de fratura patológica como primeiro sinal. O raio X de esqueleto identifica geralmente uma lesão típica expansiva, cística com um afinamento do córtex e da matriz óssea com aspecto de “vidro fosco”. A fibrodisplasia nos ossos craniofaciais evoluem com o tempo e se apresentam com nítida assimetria. As áreas mais acometidas pela fibrodisplasia são o fêmur proximal e a base do crânio, sendo que 90% de todos os ossos acometidos são identificados ao redor dos 15 anos ¹².

O surgimento de novas lesões em uma fase tardia é uma ocorrência muito incomum na fibrodisplasia óssea. A incidência de fraturas ocorre com uma maior frequência durante a infância, entre as idades de 6 e 10 anos, mas devido a anormalidades intrínsecas nos ossos fibrodisplásicos, algumas fraturas continuam ocorrendo durante a vida adulta ¹⁵.

Fonte: Dumitresco CE, 2008¹

Figura 2 – A e B) Tomografia de fêmur proximal com aparência típica de vidro fosco. **C e D)** Tomografia de crânio de uma paciente com 10 e 40 anos de idade respectivamente, demonstrando características típicas de vidro fosco na fibrodisplasia óssea. **E – G)** Cintilografia óssea de pacientes com grau variado de eformidade ósseo da fibrodisplasia, podendo se apresentar na forma monostótica (em **F**) ou poliestótica (em **G**).

1.3 Fisiopatologia

Todas as glândulas endócrinas afetadas na SMA apresentam atividade autônoma, ou seja, produção e secreção hormonal que ocorre independente de qualquer estímulo.

A observação de que a via de sinalização da proteína G/AMPc/adenil ciclase é comum a todos os tecidos afetados na SMA levou Weinstein *e col*¹⁶ a investigarem a presença de mutações ativadoras na via do cAMP. Em 1991 Weinstein *e col*¹⁶ identificaram mutações ativadoras no gene *GNAS*, localizado no cromossomo 20q13, que codifica a subunidade α_s da proteína G, responsável pela transmissão do sinal celular pós-receptor. A base molecular da SMA passou a ser identificada desde então^{16, 17}. As mutações ativadoras da proteína $G_{\alpha s}$, no codon arginina 201, foram identificadas em todos os tecidos acometidos pela SMA (osso, hipófise, ovário, pele, etc) e fibrodisplasia óssea^{16, 18} tanto poliestótica como monostótica. Recentemente, mutações no codon glutamina 227 também foram descritas na fibrodisplasia óssea isolada e em tumores hipofisários produtores de GH não associados a outras características da SMA¹⁹. No tecido hematopoiético a presença da mutação também tem sido identificada entretanto as células

mutadas são muito escassas neste tecido e considerando o seu padrão mosaico de distribuição, torna-se difícil a sua identificação.

As mutações p.R201H, p.R201S e p.R201C, presentes na SMA, estão localizadas num codon altamente conservado entre as espécies, denotando a sua importância.

A proteína Gs (estimulatória) é considerada um protooncogene que torna-se um oncogene na presença de mutações ativadoras do tipo *gsp* (G stimulatory protein). Tais mutações são *missense* ou seja de ponto nos codons 201 e 207 do gene *GNAS* mas somente as do códon 201 ocorrem na SMA. Esses sítios são extremamente importantes para a atividade intrínseca da guanosina-trifosfato (GTP) da proteína G α (estimulatória, subunidade α), levando à uma ativação constitutiva da adenil ciclase e consequentemente da transmissão do sinal celular independente do estímulo sobre o receptor transmembrana^{20 20}. Essa atividade resulta na produção intracelular contínua de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) com secreção autônoma endócrina das várias glândulas acometidas^{16, 17}. A falta da transmissão vertical da SMA, ou seja, a ausência de mutações germinativas que pudessem ser transmitidas para a prole, juntamente com a observação de que as lesões ósseas e as da pele tendem a respeitar a linha média, leva a hipótese de que estas mutações se iniciaram em diferentes estágios pós-formação do zigoto (Figura 3).

Fonte: Dumitresco CE, 2008 ¹

Figura 3 – Ocorrência de uma mutação esporádica em uma única célula (caracterizada pelo ponto brilhante) em algum estágio durante o início do desenvolvimento embriológico. Quando a mutação ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento, os tecidos oriundos das 3 camadas germinativas serão afetados. A partir dessa célula mutada, outras células afetadas irão se desenvolver, caracterizando o fenótipo da SMA.

Quanto mais precocemente ocorre a mutação, maior a chance de acometimento dos três folhetos germinativos (Figura 4) ^{1, 7}.

Destínos dos Folhetos Germinativos ou Embrionários	
Folhetos	Estruturas que originam
Endoderme	Sistema digestório (tubo digestivo e glândulas), Aparelho respiratório, Tireóide, Hipófise e Sistema Excretor (bexiga e uretra)
Mesoderme	Músculos, Sistema Genital, Sistema Urinário, Esqueleto, Tecido Conjuntivo, Córtex Adrenal, Vasos e Sangue
Ectoderme	Epiderme da pele, Sistema nervoso, Anexos, Epitério da boca e ânus, Glândulas, Medula Adrenal e Esmaltes

Fonte: Gomes, 2011 ²¹

Figura 4 – Destino dos folhetos germinativos ou embrionários.

1.4 Receptores 7 Transmembrana (7 TM)

Os receptores que transmitem o sinal celular via proteínas G possuem algumas características comuns em relação à sua estrutura. Apresentam uma região amino-terminal extracelular, uma região transmembrana com 7 domínios hidrofóbicos (α -hélices) ligados por 3 alças extracitoplasmáticas e 3 alças intracitoplasmáticas. Por apresentarem sete domínios transmembrana, são também conhecidos como receptores 7 transmembrana (7 TM). Estes receptores formam a maior família de proteínas do organismo com mais de mil diferentes membros identificados, participando juntamente com as proteínas G de um sofisticado sistema de transdução do sinal celular ²²⁻²⁴. Existem inúmeros ligantes extracelulares que podem causar uma mudança na conformação do receptor, expondo as α -hélices e ativando as proteínas G, tais como: fóton de luz, odorantes, hormônios, neurotransmissores, nucleotídeos, proteases e íons. Os efetores celulares, regulados via proteínas G são: adenilato-ciclase, as isoformas de fosfatidilinositol, fosfolipase C, fosfodiesterases dependentes de GMPc e canais iônicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) ²⁵.

1.5 Proteínas G e seus efetores

Proteínas G são compostos de alto peso molecular e ditos heterotriméricos, pois são formadas por três polipeptídios distintos, α , β e γ , formando o complexo transdutor de sinais melhor conservado entre os mamíferos. Levam este nome por interagir com grupos guanílicos guanosina difosfato (GDP) e guanosina trisfosfato (GTP). Recentemente, obtiveram-se indícios de que esse mecanismo sinalizador também estaria presente nos vegetais^{26, 27}.

Os receptores acoplados à proteína G (G protein coupled receptor, GPCR), são formados por sete domínios transmembrana, com o terminal amino no meio extracelular e o terminal carboxila no meio intracelular. Diferenças na estrutura e na seqüência desses receptores possivelmente contribuem para diferenças no reconhecimento de um ligante e no acoplamento específico a uma determinada proteína G.⁴ Os GPCR são as primeiras estruturas envolvidas na transdução celular. Logo após a interação do primeiro mensageiro com o GPCR, são vistas mudanças conformacionais na estrutura deste último, iniciando o ciclo de atividade da proteína G²⁸.

A cascata de ativação intracelular inicia sua dinâmica graças à ação de uma proteína auxiliar, guanosine nucleotide exchange factor (GEF), que desloca o GDP e dá lugar à ligação do GTP, configurando o estado ativo dessa proteína. Assim, a subunidade α dissocia-se do dímero $\beta\gamma$ e inicia

cascatas de sinalização intracelular. Isso resulta na ativação de efetores, tais como adenilato ciclases, pequenas GTPases, fosfolipases e cinases, em última análise podendo regular a expressão de genes envolvidos na sobrevivência, proliferação, diferenciação e outros processos celulares. Esse estado de ativação é mantido graças à ação da proteína guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI), que mantém o GTP ligado e a proteína ativa pelo tempo necessário ²⁹.

Uma característica importante da subunidade α é sua atividade GTPase intrínseca, que dessa forma hidrolisa o γ -fosfato do GTP e devolve a afinidade da subunidade α pelo dímero $\beta\gamma$, de forma a encerrar o ciclo de transdução e manter o trímero disponível para um novo estímulo. Entretanto, essa atividade autocatalítica é fraca, sendo necessárias as ações de mais proteínas inativadoras: a proteína ativadora da GTPase (GTPase activating protein – GAP) e os reguladores da sinalização por proteína G (regulators of G protein signaling – RGS), que aumentam a atividade da GTPase ²⁹.

As proteínas G são classificadas de acordo com a estrutura e sequência da subunidade α , sendo que as três principais isoformas são a G_s , a G_q e a G_i .

A proteína G_s , que ativa a adenilato ciclase – enzima intracelular aderida à membrana plasmática que catalisa a formação de 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (AMPc) a partir do trifosfato de adenosina (ATP) – está relacionada com o aumento da resposta celular. Assim, após a formação do complexo ligante/GPCR, a subunidade α da proteína G_s , que interage com o

nucleotídeo guanílico, catalisa a troca de GDP por GTP, assumindo a forma ativa dessa isoforma. A porção α da proteína desloca-se então do dímero $\beta\gamma$ e ativa a adenilato ciclase, resultando no aumento substancial da concentração de AMPc ³⁰.

O aumento na concentração de AMPc intracelular (na ordem de 10 nM) culmina na ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA). Essa enzima é composta por duas subunidades: uma reguladora (R), com alta afinidade pelo AMPc, e uma catalítica (C). Na ausência de AMPc, a subunidade C torna-se inativa pela formação de um complexo tetramérico R₂C₂.

A ligação do AMPc à subunidade R induz mudanças conformacionais que resultam na dissociação da holoenzima inibida e consequente ativação da PKA, que em seguida pode fosforilar diversas estruturas intracelulares, obtendo uma resposta específica ao estímulo agonista ³¹.

Fonte: Dumitrescu C, 2008¹

Figura 4 - Ativação do receptor e início do ciclo GTP

2.0 Gene *GNAS*

O gene *GNAS* (Figura 6) humano foi clonado em 1988 por Kosaza e cols.; com cerca de 20Kb, está localizado no braço longo do cromossomo 20 na região 13.1-13.2³⁰. Inicialmente, a sequência de pares de base estava distribuída em 13 éxons com 4 *splicing* *GNAS*. O seu homólogo em ratos (*Gnas*) apresenta alta complexidade com múltiplos *splicing* alternativos formando transcritos que codificam várias proteínas e transcritos não traduzidos. Utilizando promotores alternativos, os principais produtos transcritos pelo gene *GNAS* são: a conhecida proteínas GSα, a NESP 55

(*neuroendocrine secretory protein 55*) que é uma proteína semelhante à cromogranina com expressão em tecidos neuroendócrinos (medula adrenal, hipófise, hipotálamo e outras regiões do cérebro), as XLas (XLN1a e XLN1b) isoformas longas da Gs α , também apresentam expressão em tecidos neuroendócrinos (hipófise, adrenal, coração, pâncreas) com funções biológicas ainda não determinadas^{30, 32-34}.

Em humanos e ratos, a região promotora da proteína NESP55 está metilada somente no alelo paterno, sendo o alelo materno transcrito, e, contrariamente, a região promotora da XLas está metilada no alelo materno com transcritos somente do alelo paterno.

Estudos do padrão de metilação em ratos e fetos humanos, da região promotora da proteína GS α , mostraram que essa região parece constituir a marca da metilação. A expressão da proteína é bialélica em alguns tecidos (ossos) e monoalélica em outros (túbulo proximal de néfron) com a metilação do alelo paterno e expressão do alelo materno³⁵.

Fonte:Riminucci M, 2007 ³⁶

Figura 5 - Gs α : padrão de metilação e seus *splicing* alternativos formando transcritos que codificam várias proteínas, juntamente com transcritos não traduzidos.

3.0 Mutações ativadoras associadas à SMA

Mutações ativadoras em codons altamente conservados dos genes que codificam as pG, envolvidos na atividade GTPase, podem transformar o gene da subunidade α em um oncogene denominado *gsp*. Este oncogene codifica uma proteína mutada que altera o ciclo GTPase, mantendo constitutivamente o sinal celular e contribuindo desta maneira para a tumorigenese ³⁷.

Mutações no codon da arginina 201, levam à diminuição da atividade GTPase e à manutenção do sinal celular independentemente do agonista.

Tais mutações do gene da conhecida proteínas GS α foram descritas primeiramente em 40% dos adenomas pituitários somatotróficos e em 30% dos adenomas autônomos da tireóide^{20, 23, 38}.

As mesmas mutações somáticas no códon da arginina 201 do exon 8 do gene da pG α s (troca da Arginina por Cisteína, Histidina ou Serina) são encontradas nos tecidos envolvidos na SMA¹⁶, o que resulta no aumento nas concentrações intracelulares de AMPc nos diversos tecidos acometidos, principalmente nas células endócrinas e nos melanócitos.³⁹

4.0 Testes Genéticos

Em decorrência do padrão mosaico de distribuição das células mutadas em determinado tecido, um método com alta sensibilidade e especificidade capaz de detectar um número ínfimo de alelos mutadas seria de grande valia na prática clínica. Uma das técnicas utilizadas para esta finalidade é a técnica de PNA (*Peptidic Nucleic Acids*)^{40, 41}.

A técnica do PNA baseia-se na ligação do PNA/DNA e RNA em suas seqüências alvo é mais forte do que a ligação DNA/DNA ou RNA/RNA^{42, 43}. A afinidade por essa ligação dá-se em partes pela propriedade do PNA de não possuir carga. Uma vez que os PNAs são neutros em carga, as formações duplex de PNA/DNA ou PNA/RNA resultam em uma formação muito estável até em altas temperaturas, não ocorrendo repulsão eletrostática formada pela ligação DNA/DNA ou RNA/RNA.

Como resultado dessa estabilidade em altas temperaturas, temos uma alta especificidade, que em geral é mais alta que a dos híbridos de DNA/DNA ou RNA/RNA^{42, 44-48}.

Por essa razão, PNAs são freqüentemente usados como sondas para identificar mutações de ponto com alta sensibilidade⁴⁹⁻⁵³

Um estudo comparando a sensibilidade entre duas técnicas (PNA e *nested* PCR seguida de digestão enzimática) na pesquisa de mutações em DNA extraído de tecido somático de pacientes com SMA obteve a sensibilidade de 50%. Neste mesmo estudo a pesquisa de mutações em sangue periférico a sensibilidade foi de 35%⁴¹.

A técnica de genotipagem por PCR em tempo real também vem sendo muito utilizada na detecção de SNPs e também demonstrou ser sensível e específica.

No ensaio *TaqMan SNP Genotyping* as sondas que incorporam o *Minor Groove Binder* (MGB) na região 3' proporcionam uma discriminação alélica superior. A molécula MGB se liga à extremidade do sulco menor da dupla hélice do DNA melhorando a base de hibridização dos ensaios e estabiliza o complexo sonda-amostra. Isso aumenta a estabilidade de ligação e permite o uso de sondas curtas com 13 pares de base, melhorando a discriminação de erros e aumentando a flexibilidade ao projetar sondas para uma sequência complexa ou variável.

Todas as sondas MGB incluem um *quencher* sem fluorescência (NFQ) que praticamente elimina toda fluorescência de fundo quando associado à *quenchers* tradicionais, proporcionando uma melhor relação

sinal-ruído e aumentando a sensibilidade do ensaio.

As três mutações descritas na SMA diferem quanto a um único nucleotídeo com troca do aminoácido Arginina pelos aminoácidos Cisteína, Histidina ou Serina. A confecção de sondas específicas para cada mutação poderá permitir a diferenciação entre elas.

Tendo em vista todas essas informações, procuramos nesse estudo a padronização e comparação das técnicas de discriminação alélica pelo sistema Taqman e a técnica PNA na detecção das mutações ativadoras da proteína G estimulatória, causadoras da SMA.

O desenvolvimento de uma técnica simples e sensível que seja capaz de detectar essas mutações ativadoras tanto nos tecidos afetados quanto no sangue periférico, facilitaria o diagnóstico das formas não clássicas da SMA.

5.0 Objetivos

- Comparar e padronizar as técnicas de PNA e discriminação alélica por PCR em tempo real para a pesquisa de mutações ativadoras da proteína G estimulatória no codon R201 do gene *GNAS* em tecidos de pacientes com SMA.
- Aplicação das técnicas de PNA e discriminação alélica na pesquisa de mutações no codon 201 do gene *GNAS* em células de sangue periférico de pacientes com SMA.

6.0 Material e Métodos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCFMUSP e todos os pacientes e/ou seu responsável legal assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular com apoio financeiro do CNPq.

6.1 Casuística

Foram selecionados 31 pacientes com o diagnóstico clínico de SMA, 2 masculinos e 29 femininos, atendidos na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e/ou Instituto de Ortopedia da Faculdade de Medicina da USP no período de 1996 até 2012 (Ver tabela em anexo).

6.2 Métodos

Todos os DNAs extraídos de leucócito de sangue periférico, dos pacientes foram sequenciados pelo método de Sanger após clonagem para certificar a presença ou não das mutações *gsp*. Um controle positivo para a mutação p.R201H foi gentilmente cedido por Weinstein¹⁶.

O sequenciamento após clonagem possibilitou uma análise mais detalhada sobre a presença de mutações, entretanto, este método é extremamente trabalhoso para detecção rotineira na prática clínica.

Amostras de DNA de uma biópsia óssea e uma biópsia de pele de uma paciente com MAS, foram analisadas pelas técnicas de PCR seguida pelas sondas de PNA e PCR em tempo real/genotipagem, para a identificação das mutações no codon 201 do gene *GNAS*.

Após a padronização utilizando amostras de DNA de tecido, avaliamos a aplicação dessas técnicas na detecção de mutações no códon 201 do gene *GNAS* em DNA de leucócito de sangue periférico.

6.3 Biópsia de pele (mancha *café-au-lait*)

Biópsia de tecido de pele utilizando a técnica do Punch⁵⁴, onde aproximadamente 3 mm de pele foi retirado e imediatamente conservado em meio de cultura DMEN + antibiótico. O tecido foi fragmentado e distribuído em garrafas de cultura de 25 cm² em meio de cultura AMNIO MAX + 20% de

suplemento ⁵⁵.

As garrafas foram trocadas conforme o crescimento dos fibroblastos.

6.4 Extração de DNA

Extração de DNA de tecido fresco – Genomic DNA Isolation Kit

Os DNAs de tecido fresco foram extraídos de acordo com o protocolo do próprio *kit* ⁵⁶.

Extração de DNA de leucócitos - *salting out*

Os DNAs de leucócito foram extraídos pelo método de *Salting Out* de acordo com o protocolo previamente estabelecido pelo laboratório ⁵⁷.

Extração de DNA de fibroblastos de pele e de tecido congelado

Os fragmentos de tecidos obtidos por biópsia da pele com a mancha café-com-leite foram mantidos em cultura primária de fibroblastos e posteriormente realizada a extração do DNA.

Apenas um único paciente possuía tecido disponível (biópsias óssea) congelado em nitrogênio líquido e teve o DNA extraído para a análise das mutações.

5.0 Pesquisa de mutações

5.1 Sequenciamento pelo método de Sanger após clonagem

O vetor TOPO TA 2.1 foi o sistema utilizado para a clonagem do produto de PCR contendo o codon R201 do gene *GNAS*. Esse vetor permite a clonagem de produtos de PCR dentro de um plasmídeo. A clonagem foi feita seguindo o protocolo da Invitrogen ⁵⁸.

5.2 PNA

PNAs são oligonucleotídeos sintetizados que possuem a sua extremidade açúcar substituída por N-(2-aminoetil)-glicina ⁴². PNAs podem hibridizar tanto em seqüências específicas tanto no DNA quanto no RNA formando um tipo de ligação Watson-Crick PNA/cDNA e PNA/RNA, formando uma estrutura de dupla hélice. Entretanto, a formação duplex de Watson-Crick (formação duplex antiparalela) é a formação preferida do PNA ⁵⁹. PNAs também podem se hibridizar em seqüências alvo de DNA dupla hélice (dsDNA). Nesse caso, a molécula do PNA substitui uma das fitas complementares por invasão. A fita então deslocada, passa a existir como fita única e forma um D-loop na região de ligação do PNA ^{42, 60-64}.

A ligação do PNA/DNA e RNA em suas seqüências alvo é mais forte do que a ligação DNA/DNA ou RNA/RNA ^{42, 43}. A afinidade por essa ligação

dá-se em partes pela propriedade do PNA de não possuir carga. Uma vez que os PNAs são neutros em carga, as formações duplex de PNA/DNA ou PNA/RNA resultam em uma formação muito estável até em altas temperaturas, não ocorrendo repulsão eletrostática formada pela ligação DNA/DNA ou RNA/RNA.

Como resultado dessa estabilidade em altas temperaturas, temos uma alta especificidade, que em geral é mais alta que a dos híbridos de DNA/DNA ou RNA/RNA^{42, 44-48}.

Por essa razão os PNAs são freqüentemente usados como probes para identificar mutações de ponto com uma alta sensibilidade⁴⁹⁻⁵³

Fonte: Lietman SA, 2005⁴⁰

Figura 6 - Mecanismo de funcionamento da sonda do PNA. Ligação da

sonda ao alelo normal impedindo a sua amplificação.

5.3 PCR em tempo real – genotipagem

A genotipagem de SNPs por PCR em tempo real é uma técnica extremamente sensível que permite a discriminação alélica mesmo quando pequenas quantidades de DNA são disponíveis. Esta técnica utiliza sondas Taqman que diferem em relação ao nucleotídeo a ser pesquisado com emissão de fluorescências distintas de acordo com a clivagem da sonda do alelo amplificado. A identificação dos diferentes genótipos é feita pela disposição dos genótipos em um *software* de discriminação alélica que pela localização em um gráfico classifica as amostras como homozigotas para o alelo normal, homozigotas para o alelo mutado ou heterozigotas. Também pode ser utilizada o ΔC_t , ou seja, diferenças dos valores de C_t (ciclos *threshold*) de amplificação das duas sondas para determinar o genótipo de determinada amostra.

Um par de *primers* e três sondas alelo-específicas confeccionados pela Applied Biosystems e marcados com VIC ou FAM serão utilizados:

Mutação 1- p.R201H

Troca de Arginina por Histidina

A sonda marcada com o fluoróforo VIC marca o alelo selvagem G.

A sonda marcada com o fluoróforo FAM marca o alelo mutante A.

Mutação 2 – *p.R201C*

Troca de Arginina por Cisteína

A sonda marcada com o fluoróforo VIC marca o alelo selvagem C.

A sonda marcada com o fluoróforo FAM marca o alelo mutante T.

Mutação 3 – *p.R201S*

Troca de Arginina por Serina

A sonda marcada com o fluoróforo VIC marca o alelo selvagem G.

A sonda marcada com o fluoróforo FAM marca o alelo mutante C.

6.0 Resultados

6.1 Sequenciamento pelo método de Sanger após clonagem

De todos os DNAs analisados, apenas o paciente que carregava a mutação p.R201H em tecido ósseo apresentou, a mutação também em leucócito de sangue periférico.

Figura 7 - Eletroferograma do produto de PCR do *GNAS*. A) Sangue periférico de um indivíduo normal mostrando a amplificação do alelo normal (seta) B) Sangue periférico de um paciente com FD óssea isolada mostrando a amplificação do alelo mutado para a mutação p.R201H (seta) C) Tecido ósseo de um paciente com FD óssea isolada mostrando a amplificação do alelo mutado para a mutação p.R201H (seta).

6.2 Sondas PNA

O eletroferograma do produto de PCR/PNA identificou a sequência nucleotídica do alelo normal, o que demonstra que o alelo não foi bloqueado.

Figura 8 - Eletroferograma do produto de PCR do *GNAS* do sangue periférico de um indivíduo normal

6.3 PCR em tempo real/genotipagem

Mutação 1 – p.R201H

Ensaio 1

Alelo normal – representado pela linha de cor verde

Alelo mutado – representado pela linha de cor vermelha

Figura 9 - Curva de amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de tecido fibrodisplásico, controle positivo para a mutação p.R201H.

Mutação 1 – p.R201H

Ensaio 1

Alelo normal – representado pela linha de cor verde

Alelo mutado – representado pela linha de cor vermelha

Figura 10 - Curva de amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um paciente com FD óssea isolada, controle para a mutação p.R201H

Mutação 1 – p.R201H

Ensaio 1

Alelo normal – representado pela linha de cor verde

Alelo mutado – representado pela linha de cor vermelha

Figura 11 - Curva de amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um indivíduo normal.

Mutação 2 – p.R201S

Ensaio 2

Alelo Normal – representado pela linha de cor verde

Alelo Mutado - representado pela linha de cor vermelha

Figura 12 - Curva de Amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um paciente controle para a mutação p.R201S.

Figura 13 - Curva de Amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um indivíduo normal.

Mutação 3 – p.R201C

Ensaio 3

Alelo Normal – representado pela linha de cor verde

Alelo Mutado - representado pela linha de cor vermelha

Figura 14 - Curva de Amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um paciente controle para a mutação p.R201C.

Figura 15 - Curva de Amplificação em RT-PCR utilizando DNA extraído de sangue periférico de um indivíduo normal.

7.0 Discussão

O diagnóstico diferencial da SMA é feito principalmente com a neurofibromatose tipo 1, a puberdade precoce independente de gonadotrofinas e com a fibrodisplasia óssea isolada que pode representar até 7% de todos os tumores ósseos benignos. Atualmente, este diagnóstico diferencial é realizado pelas características ao diagnóstico e evolução clínica dos pacientes, já que os testes genéticos não são rotineiramente disponíveis e são limitados a poucos centros de pesquisa.

O diagnóstico molecular da SMA é, portanto, altamente dependente da sensibilidade do método de detecção. Um dos métodos mais utilizados nos dias de hoje é um método ultrassensível, baseado na ligação do PNA/DNA, que quando complementar ao alelo normal e potencializa a amplificação do alelo mutado.

Em contraste com os achados da literatura, nesse presente estudo não foi possível a reprodutibilidade de tais resultados. Não ocorreu o bloqueio da amplificação do alelo normal tampouco o enriquecimento seletivo do DNA mutado. Uma possível razão para esse acontecimento seria um erro durante a fabricação da sonda. Se um dos componentes do ácido peptídeo nucleico estiver faltando ou estiver mal localizado, isso impedirá a perfeita ligação da sonda ao DNA, prejudicando o seu funcionamento. A sonda também precisa ser perfeitamente complementar ao alelo normal. Se apenas um nucleotídeo estiver faltando, a sonda ficará empareda, não hibridando ao alelo normal e permitindo assim a sua amplificação.

No ensaio TaqMan SNP Genotyping existem 3 sondas específicas para a detecção de cada mutação. O ensaio 1, para a detecção da mutação p.R201H confirmou a presença do alelo mutado no tecido afetado do paciente e em leucócitos de sangue periférico. A presença de uma pequena amplificação em um Ct distante, quando a análise foi realizada em DNA de leucócitos de sangue periférico, confirma os achados do sequenciamento pelo método Sanger após clonagem, uma vez que de 200 colonias, o alelo mutado estava presente apenas em 1. A amplificação do alelo mutado demonstra a sensibilidade da técnica utilizada, que conseguiu identificar a presença do alelo, mesmo com uma baixa quantidade de células carreadoras da mutação.

O ensaio 2, para a detecção da mutação p.R201S, não se demonstrou sensível o suficiente para a detecção das mutações nem em DNA extraído de tecidos afetados que foram utilizados como controle para tais mutações nem em DNA extraído de sangue periférico dos pacientes com SMA. Isso pode ocorrer devido a baixa porcentagem de células mutadas ou a heterogeneidade do tecido afetado.

O ensaio 3, para a detecção da mutação p.R201C, conseguiu detectar a presença da mutação apenas no tecido afetado, o que mais uma vez pode ser explicado pela baixa quantidade de células mutadas.

Como resultado positivo, apresentamos pela primeira vez nesse trabalho o uso do RT-PCR genotipagem na detecção das mutações ativadoras da proteína G, em DNA extraído de tecidos afetados e em leucócitos de sangue periférico, sendo uma técnica fácil e de rápidos

resultados.

A ausência de mutações não necessariamente é devido a sua inexistência, e sim a baixa sensibilidade dos métodos para identificar tais mutações em pacientes com distribuição em mosaicismo das mesmas. A alta sensibilidade do PCR em tempo real/genotipagem aumenta as chances de identificação.

8.0 Conclusão

Pudemos concluir com esse estudo que a técnica de PCR em tempo real/genotipagem para detecção das mutações ativadoras da proteína G foi sensível e capaz de identificar duas das três mutações ativadoras do tipo *gsp* em DNA de leucócitos de sangue periférico, bem como nos tecidos afetados.

O uso do PCR em tempo real poderá facilitar o diagnóstico, uma vez que se trata de uma técnica rápida e fácil.

Referências

1. Dumitrescu CE, Collins MT. McCune-Albright syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:12.
2. Mastorakos G, Mitsiades NS, Doufas AG, Koutras DA. Hyperthyroidism in McCune-Albright syndrome with a review of thyroid abnormalities sixty years after the first report. *Thyroid* 1997;7:433-9.
3. Sherman SI, Ladenson PW. Octreotide therapy of growth hormone excess in the McCune-Albright syndrome. *J Endocrinol Invest* 1992;15:185-90.
4. Akintoye SO, Chebli C, Booher S, et al. Characterization of gsp-mediated growth hormone excess in the context of McCune-Albright syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5104-12.
5. Collins MT, Chebli C, Jones J, et al. Renal phosphate wasting in fibrous dysplasia of bone is part of a generalized renal tubular dysfunction similar to that seen in tumor-induced osteomalacia. *J Bone Miner Res* 2001;16:806-13.
6. Danon M, Crawford JD. The McCune-Albright syndrome. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd* 1987;55:81-115.
7. Diaz A, Danon M, Crawford J. McCune-Albright syndrome and disorders due to activating mutations of GNAS1. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2007;20:853-80.
8. Kirk JM, Brain CE, Carson DJ, Hyde JC, Grant DB. Cushing's syndrome caused by nodular adrenal hyperplasia in children with McCune-Albright syndrome. *J Pediatr* 1999;134:789-92.
9. Albright F BA, Hampton AO, Smith P. **Syndrome characterized by osteitis fibrosa disseminata, areas, of pigmentation, and endocrine dysfunction, with precocious puberty in females: report of 5 cases.** *N Engl J Med* 1937;216:727-46.
10. McCune DJ. Osteitis fibrosa cystica: the case of a nine-year-old girl who also exhibits precocious puberty, multiple pigmentation of the skin and hyperthyroidism. *Am J Dis Child* 1936;52:734-44.
11. Shenker A, Weinstein LS, Moran A, et al. Severe endocrine and nonendocrine manifestations of the McCune-Albright syndrome associated with activating mutations of stimulatory G protein GS. *J Pediatr* 1993;123:509-18.
12. Hart ES, Kelly MH, Brillante B, et al. Onset, progression, and plateau of skeletal lesions in fibrous dysplasia and the relationship to functional outcome. *J Bone Miner Res* 2007;22:1468-74.
13. Collins MT. Spectrum and natural history of fibrous dysplasia of bone. *J Bone Miner Res* 2006;21 Suppl 2:P99-P104.
14. Collins MT SA. **McCune-Albright syndrome: new insights.** *Curr Opin in Endocrinol and Diabetes* 1999;6.
15. Leet AI, Chebli C, Kushner H, et al. Fracture incidence in polyostotic fibrous dysplasia and the McCune-Albright syndrome. *J Bone Miner Res* 2004;19:571-7.
16. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 1991;325:1688-95.
17. Schwindinger WF, Francomano CA, Levine MA. Identification of a mutation in the gene encoding the alpha subunit of the stimulatory G protein of adenylyl cyclase in McCune-Albright syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:5152-6.
18. Bianco P, Riminucci M, Majolagbe A, et al. Mutations of the GNAS1 gene, stromal cell dysfunction, and osteomalacic changes in non-McCune-Albright fibrous dysplasia of bone. *J Bone Miner Res* 2000;15:120-8.
19. Idowu BD, Al-Adnani M, O'Donnell P, et al. A sensitive mutation-specific screening technique for GNAS1 mutations in cases of fibrous dysplasia: the first report of a codon 227 mutation in bone. *Histopathology* 2007;50:691-704.
20. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* 1989;340:692-6.
21. Gomes RS. Perspectivas do uso de células-tronco em Cirurgia Plástica. *Rev Bras Cir Plást* 2011;26(1):151-9.
22. Spiegel AM, Shenker A, Weinstein LS. Receptor-effector coupling by G proteins:

- implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocr Rev* 1992;13:536-65.
23. Spiegel AM, Weinstein LS, Shenker A. Abnormalities in G protein-coupled signal transduction pathways in human disease. *J Clin Invest* 1993;92:1119-25.
 24. Wess J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* 1998;80:231-64.
 25. Felig P BJ, Frohman LA. **Endocrinology and Metabolism** 3rd ed New York: Atlis Graphics & Design 1995.
 26. Spiegel AM. Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 1987;49:1-16.
 27. Habener JF. *Cyclic AMP second messenger signaling pathway*. In *Endocrinology 3rd edit In De Groot L J, et al, eds* 1995;1:77-92.
 28. Gilman AG. The Albert Lasker Medical Awards. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *JAMA* 1989;262:1819-25.
 29. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991;349:117-27.
 30. Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T, Kaziro Y. Isolation and characterization of the human Gs alpha gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:2081-5.
 31. Birnbaumer L. *Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits*. *Cell* 1992;71:1069-72.
 32. Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. Bidirectional imprinting of a single gene: *GNAS1* encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15475-80.
 33. Hayward BE BD. An imprinted antisense transcript at the human *GNAS1* locus. *Hum Mol Genet* 2000;9:835-41.
 34. Pasolli HA, Klemke M, Kehlenbach RH, Wang Y, Huttner WB. Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit XLalphas. I. Tissue distribution and subcellular localization. *J Biol Chem* 2000;275:33622-32.
 35. Liu J YS, Litman D, Chen W, Weinstein LS. Identification of a methylation imprint mark within the mouse *Gnas* locus. *Mol Cell Biol* 2000;20:5808-17.
 36. Michienzi S, Cherman N, Holmbeck K, et al. *GNAS* transcripts in skeletal progenitors: evidence for random asymmetric allelic expression of Gs alpha. *Hum Mol Genet* 2007;16:1921-30.
 37. Gupta SK, Gallego C, Johnson GL. Mitogenic pathways regulated by G protein oncogenes. *Mol Biol Cell* 1992;3:123-8.
 38. Suarez HG, du Villard JA, Caillou B, Schlumberger M, Parmentier C, Monier R. *gsp* mutations in human thyroid tumours. *Oncogene* 1991;6:677-9.
 39. Spiegel AM. The molecular basis of disorders caused by defects in G proteins. *Horm Res* 1997;47:89-96.
 40. Lietman SA, Ding C, Levine MA. A highly sensitive polymerase chain reaction method detects activating mutations of the *GNAS* gene in peripheral blood cells in McCune-Albright syndrome or isolated fibrous dysplasia. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:2489-94.
 41. Kalfa N, Philibert P, Audran F, et al. Searching for somatic mutations in McCune-Albright syndrome: a comparative study of the peptidic nucleic acid versus the nested PCR method based on 148 DNA samples. *Eur J Endocrinol* 2006;155:839-43.
 42. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991;254:1497-500.
 43. Chakrabarti MC, Schwarz FP. Thermal stability of PNA/DNA and DNA/DNA duplexes by differential scanning calorimetry. *Nucleic Acids Res* 1999;27:4801-6.
 44. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic Acids Res* 1993;21:197-200.
 45. Nielsen PE, Egholm M, Buchardt O. Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand. *Gene* 1994;149:139-45.
 46. Taylor RW, Chinnery PF, Turnbull DM, Lightowlers RN. Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids. *Nat Genet* 1997;15:212-5.
 47. Doyle DF, Braasch DA, Simmons CG, Janowski BA, Corey DR. Inhibition of gene expression inside cells by peptide nucleic acids: effect of mRNA target sequence, mismatched bases, and PNA length. *Biochemistry* 2001;40:53-64.
 48. Demidov VV, Yavnilovich MV, Belotserkovskii BP, Frank-Kamenetskii MD, Nielsen PE. Kinetics and mechanism of polyamide ("peptide") nucleic acid binding to duplex DNA. *Proc Natl*

Acad Sci U S A 1995;92:2637-41.

49. Tyler BM, Jansen K, McCormick DJ, et al. Peptide nucleic acids targeted to the neurotensin receptor and administered i.p. cross the blood-brain barrier and specifically reduce gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7053-8.

50. Orum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 1993;21:5332-6.

51. Sotlar K, Escribano L, Landt O, et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol* 2003;162:737-46.

52. Ye S, Liang X, Yamamoto Y, et al. Simultaneous detection of multiple single nucleotide polymorphism by single-strand-specific nuclease and PNA probe. *Nucleic Acids Res Suppl* 2003;185-6.

53. Basile A, Giuliani A, Pirri G, Chiari M. Use of peptide nucleic acid probes for detecting DNA single-base mutations by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2002;23:926-9.

54. ZUBER TJ. Punch Biopsy of the Skin. *Office Procedures*:1161-64.

55. Villegas JaM, M. *Current Protocols in Molecular Biology*. Copyright 2005.

56. Kit WGBP. INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620. 2012.

57. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.

58. Invitrogen. TOPO®TA Cloning® Kit User Guide 2012.

59. Egholm M, Buchardt O, Christensen L, et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* 1993;365:566-8.

60. Kurakin A, Larsen HJ, Nielsen PE. Cooperative strand displacement by peptide nucleic acid (PNA). *Chem Biol* 1998;5:81-9.

61. Lesignoli E, Germini A, Corradini R, et al. Recognition and strand displacement of DNA oligonucleotides by peptide nucleic acids (PNAs). High-performance ion-exchange chromatographic analysis. *J Chromatogr A* 2001;922:177-85.

62. Lohse J, Dahl O, Nielsen PE. Double duplex invasion by peptide nucleic acid: a general principle for sequence-specific targeting of double-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11804-8.

63. Nielsen PE, Egholm M. Strand displacement recognition of mixed adenine-cytosine sequences in double stranded DNA by thymine-guanine PNA (peptide nucleic acid). *Bioorg Med Chem* 2001;9:2429-34.

64. Demidov VV, Frank-Kamenetskii MD. Sequence-specific targeting of duplex DNA by peptide nucleic acids via triplex strand invasion. *Methods* 2001;23:108-22.