

OSTEOARTRITE: ANÁLISE CITOGENÉTICA

Osteoarthritis: Cytogenetic analysis

Marcelo Razera Baruffi¹
Edgard Eduard Engel²
Ester Silveira Ramos³
Luiz Gonzaga Tone⁴

¹Doutor em Genética –
FMRP-USP. Docente do
Departamento de Genética,
Instituto de Biociências de
Botucatu, Universidade
Estadual de São Paulo, Botu-
catu, São Paulo, Brasil.

²Doutor em Medicina –
FMRP-USP. Docente do De-
partamento de Biomecânica,
Medicina e Reabilitação
do Aparelho Locomotor,
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade
de São Paulo, Ribeirão Preto,
São Paulo, Brasil.

³Doutora em Genética –
FMRP – USP. Docente do
Departamento de Genética,
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade
de São Paulo, Ribeirão Preto,
São Paulo, Brasil.

⁴Doutor em Pediatria.
Docente do Departamento
de Puericultura e Pediatria,
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade
de São Paulo, Ribeirão Preto,
São Paulo, Brasil.

Recebido em: 30/10/2017

Aceito em: 10/01/2018

BARUFFI, Marcelo Razera *et al.* Osteoartrite: análise citogenética. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 973-981, 2017.

RESUMO

Introdução: a osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa, caracterizada por degradação da matriz extracelular e a perda de um fenótipo condrogênico na cartilagem, com etiologia complexa, a qual envolve fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. **Objetivo:** foi a análise citogenética em OA para detecção de alterações cromossômicas consistentes para estudos de biomarcadores e melhor entendimento da etiologia desta doença. **Métodos:** material obtido de lesão, com estudo histopatológico confirmando a OA, na articulação talonavicular direita de paciente, com 31 anos de idade, foi submetido à análise citogenética realizada a partir de cultura de células e bandamento GTG das metáfases. **Resultados:** o cariótipo composto evidenciou monossomia clonal dos cromossomos X, 1, 6, 9, 11, 13, 14 e 15, além das alterações estruturais de adição em 16q e 22p, deleção do 17p (com ponto de quebra que envolve o gene *TP53*) e 9qh+ (com envolvimento de 9q onde estão mapeados loci associados à OA). **Conclusão:** foram encontradas alterações cromossômicas já descritas na literatura para OA e outras ainda não referidas, mas anteriormente encontradas em outras doenças. As análises genética e epigenética da OA podem auxiliar na descoberta de biomarcadores

de prognóstico e ser utilizadas, futuramente, na rotina médica para um melhor manejo dos pacientes.

Palavras-chave: Osteoartrite. Citogenética. Prognóstico. Medicina Translacional.

ABSTRACT

Introduction: *Osteoarthritis (OA) is a degenerative disease, characterized by extracellular matrix degradation and loss of a chondrogenic phenotype in the cartilage. OA has a complex etiology involving genetic, epigenetic, and environmental factors.* **Objective:** *the main aim of our study was the cytogenetic analysis in OA for detection of consistent chromosomal abnormalities for biomarker studies.* **Methods:** *a sample, with histopathology analysis confirming OA, was obtained from the right talonavicular joint of a 31-year-old female patient. Cytogenetic analysis was carried out after cell culture and GTG banding.* **Results:** *The clonal numerical alterations were monosomies of chromosomes X, 1, 6, 9, 11, 13, 14 and 15. We detected an addition material on 16q, and 22p, deletion of the 17p (with the breakpoint involving the TP53 gene) and 9qh + (significant loci on chromosome 9q have been associated with OA).* **Conclusion:** *we found chromosomal aberrations reported in the literature and other alterations not yet described, but previously reported in other diseases. Genetic and epigenetic analysis of OA may allow the discovery of prognostic biomarkers and they could influence, in the future, the medical routine for better management of patients.*

Keywords: *Osteoarthritis. Cytogenetics. Prognosis. Translational Medicine.*

INTRODUÇÃO

A Osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa das articulações, que reduz substancialmente a qualidade de vida e uma das principais causas de incapacidade física em adultos (WAN *et al.*, 2012; NGUYEN *et al.*, 2017). Ela é caracterizada principalmente por degradação da matriz extracelular e a perda de um fenótipo condrogênico na cartilagem (WAN *et al.*, 2012). O diagnóstico, baseado no exame clínico e radiológico, fornece pouca informação sobre as alterações metabólicas nos tecidos articulares, o início da doença e sua

BARUFFI, Marcelo
Razera *et al.*
Osteoartrite: análise
citogenética. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 36, n. 4,
p. 973-981, 2017.

BARUFFI, Marcelo
Razera *et al.*
Osteoartrite: análise
citogenética. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 36, n. 4,
p. 973-981, 2017.

progressão. Também não há terapia específica e o tratamento médico é baseado no manejo dos sintomas e desaceleração da progressão da doença (NGUYEN *et al.*, 2017).

A busca pela identificação de marcadores que possam indicar o diagnóstico preciso, a resposta terapêutica e a maior sobrevida dos pacientes tem sido intensa. Avanços na genética e epigenética poderão fornecer ferramentas para dissecar a etiologia complexa da OA (YUCESYOY *et al.*, 2015). Estudos citogenéticos possibilitam um melhor entendimento da etiologia e prognóstico de doenças. Alterações cromossômicas vêm auxiliando na identificação de genes candidatos, que são posteriormente estudados por meio de técnicas de Biologia Molecular, na procura por biomarcadores. O envolvimento de fatores genéticos associados à OA tem sido verificado por estudos epidemiológicos, mas há poucos relatos de análises citogenéticas destas lesões. Vários estudos de ligação identificaram regiões com provável papel na suscetibilidade à OA (ARCOGEN CONSORTIUM *et al.*, 2012; YUCESYOY *et al.*, 2015).

Existem diferenças dos resultados das pesquisas em OA descritas na literatura dependendo dos países em que esses trabalhos foram conduzidos, bem como da região do corpo afetada (TSEZOU *et al.*, 2006; TAIPALE *et al.*, 2016).

O objetivo principal do presente trabalho foi estudar material obtido durante cirurgia de um caso de paciente brasileira com OA, por meio de análise citogenética, para detecção de alterações cromossômicas consistentes para estudos de biomarcadores e melhor entendimento da etiologia desta doença.

PACIENTE, MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Conselho de Ética e Pesquisa do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu (Of. 144/08 – CEP).

A paciente, uma mulher de 31 anos, foi encaminhada ao HCFMRP–USP devido à dor espontânea em pé direito há 7 anos. A radiografia simples de tornozelo e pé direitos revelou esporão plantar de calcâneo, discretos osteófitos marginais em maléolo tibial e articulação cubocalcânea, além de irregularidade de contornos com redução do espaço articular talonavicular e esclerose adjacente. Foi realizada biópsia que mostrou, no estudo anatomopatológico, fragmentos de tecido fibroadiposo rico e vascularizado, exibindo edema e infiltrado linfocitário inespecífico focal. O quadro histopatológico foi considerado compatível com o diagnóstico clínico de OA. A cirurgia foi realizada 3 meses após, com suspeita diagnóstica de

OA no talonavicular direito, sendo realizada artrodese do talonavicular com haste e parafuso metálico. Nessa ocasião, foi coletada amostra para a análise citogenética. As culturas para micobactérias e fungos não mostraram crescimento.

Um ano após, devido à persistência de dor local, foi indicada nova cirurgia sendo encontrada artrose talonavicular e realizada artrodese talonavicular. Quatro anos depois da segunda cirurgia, a paciente continuava a referir dor, mas nova cirurgia foi desaconselhada devido ao desenvolvimento de obesidade mórbida (estatura de 1,60m e peso de 122.400g) nesse período.

Análise Citogenética

A amostra da lesão foi coletada durante a intervenção cirúrgica, sendo os fragmentos lançados em cultura, e, posteriormente, foram realizados procedimentos metodológicos de bandeamento GTG segundo descrito anteriormente (BARUFFI *et al.*, 2001b). A análise citogenética foi realizada conforme recomendações do *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN) 2016 (SHAFER e TOMMERUP, 2016).

RESULTADO

A análise citogenética (FIGURA 1) revelou o cariótipo composto: 39~46,XX,-X[3],-1[3],-6[4],-9[3],9qh+[3],-11[3],-13[3],-14[3],-15[3],add(16)(?:p13.2→pter)[8],del(17)(p11.1)[2],add(22)(p11.2)[4]cp[16]/46,XX[8].

BARUFFI, Marcelo
Razera *et al.*
Osteoartrite: análise
citogenética. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 36, n. 4,
p. 973-981, 2017.

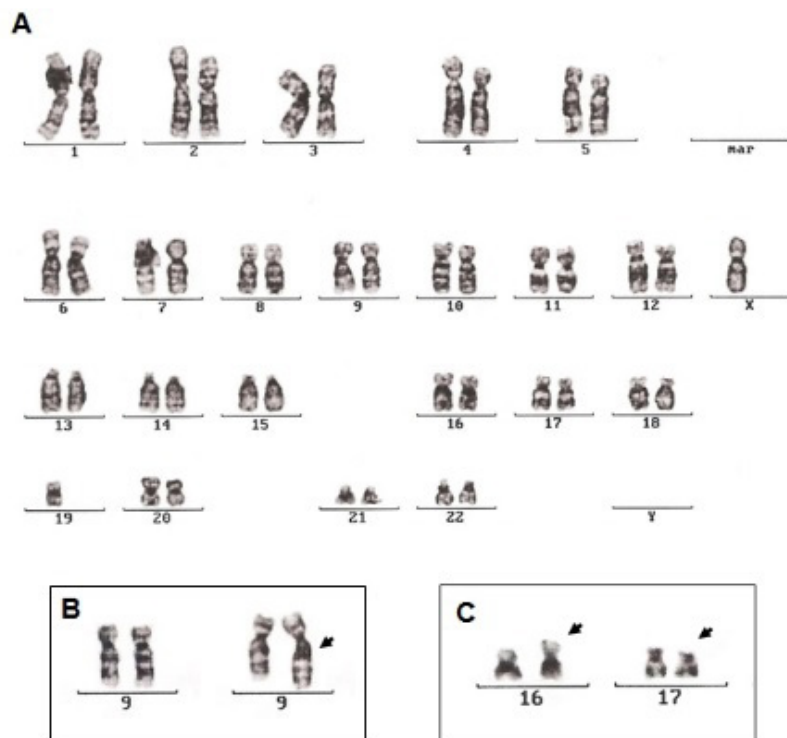


Figura 1 - Análise citogenética. (A) Célula metafásica em bandamento GTG com cariótipo 44, X,-X,-19, evidenciando a monossomia dos cromossomos X (clonal, presente em outras metafases) e 19 (não clonal). (B) Cariótipo parcial de duas células diferentes mostrando um par de cromossomos 9 normal e um par com um cromossomo normal e outro 9qh+ (seta). (C) Cariótipo parcial mostrando material adicional no cromossomo 16p (seta) e deleção do cromossomo 17p (seta).

O resultado da análise revelou monossomia dos cromossomos X (encontrada em três células), 1 (três células), 6 (quatro células), 9 (três células), 11 (três células), 13 (três células), 14 (três células) e 15 (três células). Como alterações estruturais, foram encontrados: material cromossômico adicional de origem não conhecida no braço curto do cromossomo 16 e do braço curto do cromossomo 22, deleção do braço curto do cromossomo 17 e duplicação da região pericentromérica do cromossomo 9. Oito células foram consideradas normais (46,XX).

DISCUSSÃO

Os estudos genéticos de OA da literatura, em sua maioria, analisam lesões em outras articulações (joelho e quadril), com poucas

exceções (TAIPALE *et al.*, 2016), como no caso do presente estudo. Há algum tempo já vem sendo verificada a associação de alterações genéticas com OA envolvendo o braço longo do cromossomo 6 (6q) e o braço curto do cromossomo 16 (16p) (TSEZOU *et al.*, 2006). Mais recentemente, foi relatado que o microRNA melhor correlacionado com a AO é o miR-140, mapeado no cromossomo 16 (D'ADAMO *et al.*, 2017). Em um trabalho anterior do nosso laboratório também foram encontradas alterações envolvendo uma inversão do cromossomo 16, em outro tipo de lesão, um cisto ósseo (Baruffi *et al.*, 2001a). No estudo atual, foram encontradas alterações clonais tanto do cromossomo 6 (perda deste cromossomo) quanto em 16p (material adicional nesta região, o que pode estar relacionado tanto com duplicação quanto com deleção, no caso de uma translocação), e que poderiam corroborar os dados da literatura. Também foi encontrada, no presente estudo, deleção do braço curto do cromossomo 17 (del 17p11.1), região onde está mapeado o gene *TP53*, um importante gene supressor tumoral, envolvido em processos proliferativos regenerativos teciduais (CHARNI *et al.*, 2017).

Uma alteração consistente e recorrente encontrada no presente trabalho foi a do braço longo do cromossomo 9. Trata-se de duplicação da região de heteromorfismo no cromossomo 9 (9qh+). Não foi possível a avaliação de material com outra origem (por exemplo, sangue), para a confirmação de qual seria a linhagem celular original da paciente, se com o 9qh+ ou com 9 normal. A quantidade maior de células sem a duplicação seria um indício de que esta seria a linhagem original.

As alterações de heterocromatina pericentromérica do cromossomo 9 são consideradas por muitos autores como sem repercussão clínica. No caso da duplicação da região pericentromérica do braço longo do cromossomo 9 (9qh+), estima-se que 2% da população apresenta esse polimorfismo (HUMPHRAY *et al.*, 2004). No entanto, o aparecimento de duas linhagens celulares (mosaicismo) envolvendo esse tipo de alteração cromossômica é raríssimo. Há relatos na literatura de inversão dessa mesma região adquirida em pacientes com leucemia (BETZ *et al.*, 2005; UDAYAKUMAR *et al.*, 2009). Nesses casos, o envolvimento dessa região acarretaria efeitos epigenéticos que auxiliariam no desenvolvimento da doença. Alterações epigenéticas em OA só recentemente têm sido descritas por análise de metilação do DNA (PAPATHANASIOU *et al.*, 2015) e de microRNAs (D'ADAMO *et al.*, 2017).

Ao mesmo tempo, a região duplicada, no nosso trabalho, parece se estender para uma região maior do que apenas a da região de heteromorfismo. Pesquisas para identificação em larga escala de loci

BARUFFI, Marcelo
Razera *et al.*
Osteoartrite: análise
citogenética. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 36, n. 4,
p. 973-981, 2017.

BARUFFI, Marcelo
Razera *et al.*
Osteoartrite: análise
citogenética. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 36, n. 4,
p. 973-981, 2017.

associados à OA têm mostrado alterações de 9q, como por exemplo, próximo ao gene da *Astrotactina 2 (ASTN2)* (ARCOGEN CONSORTIUM *et al.*, 2012).

Para os cromossomos X, 6, 11 e 13 foram encontradas monossomias clonais no presente trabalho e não alterações estruturais. Embora essas alterações sejam menos específicas, estudos de ligação identificaram regiões com provável papel na susceptibilidade à OA nesses cromossomos (ARCOGEN CONSORTIUM *et al.*, 2012; Yucesoy *et al.*, 2015), incluindo o gene *MCF2L*, mapeado em 13q34, o qual estaria mais relacionado com a dor da AO do que com alterações estruturais (HOCHBERG *et al.*, 2013).

CONCLUSÃO

No presente caso, foram encontradas alterações cromossômicas já descritas na literatura para OA e outras ainda não referidas, mas já descritas em neoplasias. Essas últimas apontam que a lesão encontrada na paciente poderia ter uma evolução mais agressiva e que necessitaria de um seguimento periódico para acompanhar a sua evolução, o que foi confirmado em parte pelas recorrências posteriores da lesão.

A avaliação genética e epigenética da OA poderá ser aplicada na Medicina Translacional, por meio de marcadores que confirmem o diagnóstico, bem como com indicadores de prognóstico das lesões, podendo ser utilizados, no futuro, na rotina médica para um melhor manejo dos pacientes.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio da FAEPA-HCFMRP-USP, CAPES-PROEX, FAPESP (Processos 08/51903-2 e 01/07991-5) e CNPq (Processo 307428/2015-0).

REFERÊNCIAS

- ARCOGEN CONSORTIUM; ARCOGEN COLLABORATORS, ZEGGINI, E.; PANOUTSOPOULOU, K.; SOUTHAM, L.; RAYNER, N.W.; et al. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. **Lancet**, London, n. 1, v. 380, p. 815-823, 2012.
- BARUFFI, M.R.; BARBIERI NETO, J.; BARBIERI, C.H.; CASARTELLI, C. Aneurysmal bone cyst with chromosomal changes involving 7q and 16p. **Cancer Genet Cytogenet**, New York, n. 2, v. 129, p. 177-180, 2001a.
- BARUFFI, M.R.; VOLPON, J.B.; BARBIERI NETO, J.; CASARTELLI, C. Osteoid osteomas with chromosome alterations involving 22q. **Cancer Genet Cytogenet**, New York, n. 2, v. 124, p. 127-131, 2001b.
- BETZ, J.L.; BEHAIRY, A.S.; RABIONET, P.; TIRTORAHARDJO, B.; MOORE, M.W.; COTTER, P.D. Acquired inv(9): what is its significance? **Cancer Genet Cytogenet**, New York, n. 1, v. 160, p. 76-78, 2005.
- CHARNI, M.; ALONI-GRINSTEIN, R.; MOLCHADSKY, A.; ROTTER, V. p53 on the crossroad between regeneration and cancer. **Cell Death Differ**, London, n. 1, v. 24, p. 8-14, 2017.
- D'ADAMO, S.; CETRULLO, S.; MINGUZZI, M.; SILVESTRI, Y.; BORZÌ, R.M.; FLAMIGNI, F. MicroRNAs and Autophagy: Fine Players in the Control of Chondrocyte Homeostatic Activities in Osteoarthritis. **Oxid Med Cell Longev**, New York, doi: 10.1155/2017/3720128 [Epub ahead of print], 2017.
- HOCHBERG, M.C; YERGES-ARMSTRONG, L; YAU, M.; MITCHELL B.D. Genetic epidemiology of osteoarthritis: recent developments and future directions. **Curr Opin Rheumatol**, Cambridge, n. 2, v. 25, p. 192-197, 2013.
- HUMPHRAY, S.J.; OLIVER, K.; HUNT, A.R.; PLUMB, R.W.; LOVELAND, J.E.; HOWE, K.L.; et al. DNA sequence and analysis of human chromosome 9. **Nature**, Londres, n. 27, v. 429, p. 369-74, 2004.
- NGUYEN, L.T.; SHARMA, A.R.; CHAKRABORTY, C.; SAIBABA, B.; AHN, M.E.; LEE, S.S. Review of Prospects of Biological Fluid Biomarkers in Osteoarthritis. **Int J Mol Sci**, Basileia, n. 3, v. 18, doi: 10.3390/ijms18030601 [Epub ahead of print], 2017.
- BARUFFI, Marcelo
Razera et al.
Osteoartrite: análise citogenética. *SALUSVITA*, Bauru, v. 36, n. 4, p. 973-981, 2017.

BARUFFI, Marcelo
Razera *et al.*
Osteoartrite: análise
citogenética. *SALUSVITA*,
Bauru, v. 36, n. 4,
p. 973-981, 2017.

PAPATHANASIOU, I.; KOSTOPOULOU, F.; MALIZOS, K.N.; TSEZOU, A. DNA methylation regulates sclerostin (SOST) expression in osteoarthritic chondrocytes by bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induced changes in Smads binding affinity to the CpG region of SOST promoter. **Arthritis Res Ther**, London, n. 1, v. 17, p. 160, 2015.

SHAFFER, L.G.; TOMMERUP, N. **ISCN (2016): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Basileia: S. Karger, 2016.

TAIPALE, M.; JAKKULA, E.; KÄMÄRÄINEN, O.P.; GAO, P.; SKARP, S.; BARRAL, S.; KIVIRANTA, I.; KRÖGER, H.; OTT, J.; WEI, G.H.; ALA-KOKKO, L.; MÄNNIKKÖ, M. Targeted resequencing of linkage region on 2q21 identifies a novel functional variant for hip and knee osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, Amsterdam, n. 4, v. 24, p. 655-663, 2016.

TSEZOU, A.; KARACHALIOS, T.; FYTILI, P.; GIANNATOU, E.; CHRISTODOULOU, K.; HADJIGEORGIOU, G.M.; MALIZOS, K.N. Absence of linkage to chromosomes 6q and 16p in a Greek population with knee osteoarthritis. **J Orthop Res**, Hoboken, n. 9, v. 24, p. 1900-1905, 2006.

UDAYAKUMAR, A.M.; PATHARE A.V.; DENNISON, D.; RAE-BURN, J.A. Acquired pericentric inversion of chromosome 9 in acute myeloid leukemia. **J Appl Genet**, Cheshire, n. 1, v. 50, p. 73-76, 2009.

WAN, R.; HU, J.; ZHOU, Q.; WANG, J.; LIU, P.; WEI, Y. Application of co-expressed genes to articular cartilage: new hope for the treatment of osteoarthritis (review). **Mol Med Rep**, Atenas, n. 1, v. 6, p. 16-18, 2012.

YUCESOY, B.; CHARLES, L.E.; BAKER, B.; BURCHFIEL, C.M. Occupational and genetic risk factors for osteoarthritis: A review. **Work**, Boston, n. 2, v.50, p. 261-273, 2015.