

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
MESTRADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ANNANDA PINK HOLTZ

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA EM UMA
GRANDE COORTE DE PACIENTES NO BRASIL**

Porto Alegre

2022

ANNANDA PINK HOLTZ

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA EM UMA
GRANDE COORTE DE PACIENTES NO BRASIL**

A apresentação desta dissertação é requisito parcial para título de mestre do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Professora Doutora Têmis Maria Félix

Porto Alegre

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Holtz, Annanda Pink
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA
EM UMA GRANDE COORTE DE PACIENTES NO BRASIL / Annanda
Pink Holtz. -- 2022.
84 f.
Orientadora: Têmis Maria Félix.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Osteogênese Imperfeita. 2. Colágeno tipo I. 3.
Diagnóstico molecular. 4. Painel de genes. I. Félix,
Têmis Maria, orient. II. Título.

ANNANDA PINK HOLTZ

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA EM UMA
GRANDE COORTE DE PACIENTES NO BRASIL**

A apresentação desta dissertação é requisito parcial para título de mestre do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Professora Doutora Têmis Maria Félix

Porto Alegre, 01 de junho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Professora Doutora Débora Romeo Bertola
Universidade de São Paulo – USP (São Paulo – SP)

Professora Doutora Sandra Leistner-Segal
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Dr^a. Marina Siebert
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dedico este trabalho a todas as pessoas que estiveram ao meu lado ao longo desta caminhada. Aos meus pais e familiares pelo apoio, amparo e suporte; à minha orientadora Dr^a Temis e à Dr^a Liliane que me passaram todo o conhecimento, suporte e ferramentas para desenvolver esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu pai e minha mãe por sempre estarem presentes, apoiarem e incentivarem toda a minha jornada acadêmica, sempre me estendendo o braço nos momentos que precisei. Quero agradecer aos demais familiares que sempre tinham uma palavra de incentivo e carinho, e foram compreensivos nos momentos de ausência durante esse período de estudos. Aos meus queridos amigos, quero agradecer o acolhimento, força, amor e intermináveis chamadas de vídeo que foram cruciais durante essa pandemia. Gostaria de citar especialmente meus amigos Eduarda, Arthur, Leo e Luane que em todos os momentos de incerteza e angústia estiveram presentes para dar um abraço, uma palavra de carinho ou um conselho.

À minha orientadora, Temis, gostaria de agradecer pela oportunidade, pela confiança em mim para realizar esse trabalho, pelo tempo dedicado à orientação, por todo conhecimento e experiência que me proporcionou. Gostaria de agradecer à Liliane que foi uma grande professora, sempre disposta a ajudar e ensinar tudo o que eu precisava para realizar este trabalho, além de se tornar uma pessoa com quem eu podia conversar e desabafar. À instituição de ensino UFRGS e ao HCPA, essencial no meu processo de formação profissional, pelo espaço para realização da pesquisa e por todo aprendizado.

Por fim, sou grata a todos que participaram, direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho, enriquecendo o meu processo de aprendizado e colaborando com a pesquisa.

.

RESUMO

Introdução: A osteogênese imperfeita é uma condição genética rara caracterizada principalmente pela fragilidade óssea. A maioria dos casos é causada por alteração nos genes que codificam o colágeno tipo 1, *COL1A1* e *COL1A2*. Outros genes que participam das modificações pós-traducionais, enovelamento da tripla hélice, crosslink, mineralização, desenvolvimento ósseo, diferenciação e maturação celular também já foram relacionados com OI demonstrando a heterogeneidade genética desta condição. **Objetivo:** Realizar a caracterização molecular de osteogênese imperfeita no Brasil. **Métodos:** Os casos foram selecionados na Rede Brasileira de Osteogênese Imperfeita e dados clínicos coletados. A análise molecular foi realizada no equipamento Ion Torrent através de painel de NGS que cobre 99,6% da região de codificação de 18 genes para OI. **Resultados:** Foram incluídos 156 pacientes nas análises moleculares, variantes foram detectadas em 121 casos. Alterações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* representam a maioria dos casos (88,4%), enquanto em 1,7% foram detectadas variantes em *IFITM5* e em 9,9% em genes com padrão de herança recessiva: *FKBP10* (4), *CRTAP* (1), *P3H1* (3), *PIIB* (2), *SERPINH1* (1) e *TMEM38B* (1). No total, 91 variantes diferentes foram identificadas, 25 consideradas novas. Das 65 variantes em *COL1A1*, 40 eram qualitativas e 25 quantitativas, e em *COL1A2*, 40 eram qualitativas e 2 quantitativas. A consanguinidade foi observada em 9 casos com variantes em *COL1A1*, *COL1A2*, *CRTAP*, *FKBP10*, *SERPINH1* ou *P3H1*. Uma variante (c.179A>C; p.Gln60Pro) em *FKBP10* foi detectada em 3 casos não relacionados residentes na Bahia; sugerindo um efeito fundador. Oito indivíduos, com variabilidade fenotípica, apresentam uma mesma variante em *COL1A2* (c.2341G>A; p.Gly781Ser); 4 demonstram um tipo leve e 4 moderado. Dados clínicos foram coletados em 113 pacientes, 43 apresentaram fenótipo do tipo IV, enquanto 25 tipo I, 35 tipo III, 1 tipo II e 1 tipo V. Foi identificado um caso da variante c.119C>G (p.Ser40Trp) em *IFITM5* que apresenta OI leve. História familiar positiva foi identificada em 36,5% dos casos, 92,03% tinham esclera azulada e 58% tinham dentinogênese imperfeita. Alterações quantitativas em *COL1A1* e *COL1A2* foram observadas em 24,5% da amostra e a maioria dos casos apresentavam OI leve. Em 75,5%, alterações qualitativas estavam associadas à OI moderada, grave ou letal; 49,3% desses casos apresentaram uma troca de glicina por serina. **Conclusão:** Como já relatado, a maioria dos casos se concentram nos genes *COL1A1* e *COL1A2*. OI de causa autossômica recessiva foi identificada em 9% da amostra. Mais estudos são necessários para confirmar o efeito fundador nos casos da variante possivelmente fundadora em *FKBP10*. Dados desta grande coorte permitem compreender o fenótipo e o genótipo da OI no Brasil.

Palavras-chave: Osteogênese Imperfeita. Colágeno tipo I. Diagnóstico molecular. Painel de genes.

ABSTRACT

Introduction: Osteogenesis imperfecta is a rare genetic condition mainly characterized by bone fragility. Most cases are caused by alteration in the genes that encode type 1 collagen, *COL1A1* and *COL1A2*. Other genes that participate in post-translational modifications, triple helix folding, crosslink, mineralization, bone development, differentiation and cell maturation also play a role in OI, demonstrating the genetic heterogeneity of this condition. **Objective:** To perform molecular characterization of osteogenesis imperfecta in Brazil. **Methods:** Cases were selected at the Brazilian Osteogenesis Imperfecta Network and clinical data collected. Molecular analysis was performed in the Ion Torrent equipment through an NGS panel that covers 99.6% of the coding region of 18 genes for OI. **Results:** 156 patients were included in the molecular analyses, variants were detected in 121 cases. Alterations in *COL1A1* and *COL1A2* genes represent the majority of cases (88.4%), while variants were detected in *IFITM5* in 1.7% and in 9.9% in genes with recessive inheritance pattern: *FKBP10* (4), *CRTAP* (1), *P3H1* (3), *PIIB* (2), *SERPINH1* (1) and *TMEM38B* (1). In total, 91 different variants were identified, 26 of which were considered novel. Of the 65 variants in *COL1A1*, 40 were qualitative and 25 were quantitative, and in *COL1A2*, 40 were qualitative and 2 were quantitative. Consanguinity was observed in 9 cases with variants in *COL1A1*, *COL1A2*, *CRTAP*, *FKBP10*, *SERPINH1* or *P3H1*. A variant (c.179A>C; p.Gln60Pro) in *FKBP10* was detected in 3 unrelated cases residing in Bahia, suggesting a founder effect. Eight individuals, with phenotypic variability, present the same variant in *COL1A2* (c.2341G>A; p.Gly781Ser): 4 demonstrate a mild type and 4 moderate. Clinical data were collected on 113 patients, 43 had a type IV phenotype, while 25 type I, 35 type III, 1 type II and 1 type V. One case of variant c.119C>G (p.Ser40Trp) was identified in *IFITM5* with mild OI. A positive family history was identified in 36.5% of cases, 92.03% had blue sclera and 58% had dentinogenesis imperfecta. Quantitative changes in *COL1A1* and *COL1A2* were observed in 24.5% of the sample and most cases have mild OI. In 75.5%, qualitative changes were associated with moderate, severe, or lethal OI; 49.3% of these cases showed an exchange of glycine for serine. **Conclusion:** As already reported in the literature, most cases are concentrated in the *COL1A1* and *COL1A2* genes. OI of autosomal recessive inheritance was identified in 9% of the sample. More studies are needed to confirm the possible founder effect of the variant in *FKBP10*. Data from this large cohort allow us to understand the phenotype and genotype of OI in Brazil.

Keywords: Osteogenesis imperfecta. Type 1 collagen. Molecular diagnosis. Gene panel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras da dissertação:

Figura 1 – Estrutura do colágeno tipo 1.....	21
Figura 2 – Síntese e processamento do colágeno tipo 1.....	23
Figura 3 – Diferenciação de osteoblastos e mineralização.....	26

Figuras do artigo:

<i>Figure 1 – The distribution of mutations in COL1A1 in relation to OI type.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 2 - The distribution of mutations in COL1A2 in relation to OI type.....</i>	<i>55</i>

LISTA DE TABELAS

Tabelas da dissertação:

Tabela 1 - Classificação molecular da osteogênese imperfeita de acordo com o OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man).....	18
Tabela 2 - Estudos genéticos da OI no Brasil.....	30

Tabelas do artigo:

<i>Table 1 – Clinical and molecular characteristics of the sample with variants reported in collagen genes (COL1A1 or COL1A2) and non-collagen genes (CRTAP, P3H1, PPIB, TMEM38B, SERPINH1, FKBP10 and IFITM5).....</i>	<i>51</i>
<i>Table 2 – Relationship between protein defects in COL1A1 and COL1A2 and OI type.....</i>	<i>53</i>
<i>Table 3 – Variants in non-collagen genes.....</i>	<i>56</i>
<i>Supplementary table.....</i>	<i>65</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOI	Associação Nacional de Osteogênese Imperfeita
BMP1	<i>Bone morphogenetic protein 1</i>
CCDC134	<i>Coiled-coil domain containing 134</i>
COL1A1	<i>Collagen type I alpha 1 chain</i>
COL1A2	<i>Collagen type I alpha 2 chain</i>
CREB3L1	<i>cAMP responsive element binding protein 3 like 1</i>
CRTAP	<i>Cartilage associated protein</i>
FKBP10	<i>FKBP prolyl isomerase 10</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IFITM5	<i>Interferon induced transmembrane protein 5</i>
KDEL2	<i>KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 2</i>
MBTPS2	<i>Membrane bound transcription factor peptidase, site 2</i>
MESD	<i>Mesoderm development LRP chaperone</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OI	Osteogênese Imperfeita
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
P3H1	<i>Prolyl 3-hydroxylase 1</i>
PPIB	<i>Peptidylprolyl isomerase B</i>
SERPINF1	<i>Serpin family F member 1</i>
SERPINF1	<i>Serpin family F member 1</i>
SERPINH1	<i>Serpin family H member 1</i>
SMPD3	<i>Sphingomyelin phosphodiesterase 3</i>
SP7	<i>Sp7 transcription factor</i>
SPARC	<i>Secreted protein acidic and cysteine rich</i>
TENT5A	<i>Terminal nucleotidyltransferase 5A</i>
TMEM38B	<i>Transmembrane protein 38B</i>
WNT1	<i>Wnt family member 1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 EPIDEMIOLOGIA.....	15
2.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA.....	15
2.3 CLASSIFICAÇÕES.....	15
2.3.1 Classificação Clínica	16
2.3.2 Classificação Molecular	18
2.4 BIOSÍNTESE DO COLÁGENO TIPO 1.....	20
2.4.1 Estrutura do colágeno	21
2.4.1.1 Defeitos do colágeno tipo 1.....	21
2.4.1.2 Modificações pós traducionais do colágeno tipo 1.....	22
2.4.1.3 Processamento, enovelamento e crosslink do colágeno tipo 1.....	24
2.4.1.4 Ossificação e mineralização óssea.....	26
2.4.1.5 Diferenciação e função dos osteoblastos.....	27
2.4.1.6 Outros genes relacionados à OI.....	28
2.5 OSTEOGÊNESE IMPERFEITA NO BRASIL.....	29
2.6 ESTUDOS SOBRE GENÉTICA DA OI NO BRASIL.....	30
3. JUSTIFICATIVA	32
4. HIPÓTESE	33
5. OBJETIVOS	34
5.1 GERAL.....	34
5.2 ESPECÍFICOS.....	34
6. METODOLOGIA	35
6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	35
6.2 LOCAL.....	35
6.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	35
6.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS.....	35
6.4.1. Amostras de DNA	35
6.4.2. Análise por sequenciamento de nova geração	35
6.4.3. Sequenciamento por Sanger	36
6.4.4. Dados clínicos	37

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	38
REFERÊNCIAS	39
7. RESULTADOS	44
7.1 ARTIGO 1.....	44
8. CONCLUSÕES	73
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os Pais do Paciente.....	75
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Paciente Maior de Idade.....	78
APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os Responsáveis pelo Paciente	81

1. INTRODUÇÃO

A osteogênese imperfeita (OI) é um grupo de doenças raras caracterizada por baixa densidade óssea e múltiplas fraturas, causada por alterações em genes da biossíntese do colágeno tipo 1. Apresenta heterogeneidade genética e ampla variabilidade clínica com quadro leve, moderado, grave ou letal. As principais características clínicas da OI são baixa densidade óssea, fraturas de repetição, baixa estatura e progressiva deformidade óssea, principalmente nos ossos longos. Outras manifestações clínicas que também constituem o quadro clínico são: escleras acinzentadas ou azuladas, dentinogênese imperfeita (DI), frouxidão ligamentar e surdez progressiva (ETICH *et al*, 2020; MAROM *et al*, 2020).

A OI foi inicialmente classificada clínica e radiologicamente pelo médico australiano David Sillence em 1979 em 4 tipos. A OI tipo I apresenta quadro leve, tipo II letal, tipo III grave e tipo IV moderado (TAUER *et al*, 2019). Em 2000, foi reconhecido um novo fenótipo de OI, sendo chamado de tipo V (GLORIEUX *et al*, 2000). A partir do sequenciamento completo dos genes do colágeno *COL1A1* e *COL1A2*, vários casos, principalmente de OI forma grave ou letal foram descritos sem mutações nestes genes, permitindo a identificação de novas formas clínicas de OI e de novos genes relacionados à biossíntese do colágeno. Até o momento, cerca de 20 genes foram descritos no *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), sendo eles ligados à síntese, processamento e modelagem do colágeno tipo 1 (EFTHYMIOU *et al*, 2021). Dessa forma a classificação também pode ser baseada segundo o gene e a ordem em que foi descrito sendo os tipos I-IV causada pelos genes *COL1A1* e *COL1A2*, tipo V causada por *IFITM5*, tipo VI causada por *SERPINF1*, tipo VII causada por *CRTAP*, tipo VIII por *P3H1* e assim por diante (MAROM *et al*, 2020; VAN DIJK *et al*, 2020; JOVANOVIC *et al*, 2021).

Oitenta e cinco a noventa por cento dos casos de OI são causados por alterações nos genes *COL1A1*, *COL1A2* e *IFITM5* de herança autossômica dominante (TAUER *et al*, 2019). Alterações em *COL1A1* e *COL1A2* causam mudanças quantitativas ou qualitativas do colágeno tipo 1. Alterações quantitativas levam a OI na forma leve, enquanto alterações qualitativas à OI na forma moderada, grave ou letal. Setenta e cinco a 80% dos defeitos estruturais

do colágeno são causados por mutações que resultam na substituição da glicina por outro aminoácido (LI *et al*, 2019; MARINI *et al*, 2020).

Mutações nos genes *CRTAP*, *P3H1*, *PPIB*, *WNT1*, *TMEM38B*, *SERPINH1*, *BMP1*, *SP7*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SMPD3*, *CREB3L1*, *PLOD2*, *SPARC*, *TENT5A*, *MESD*, *KDEL2* e *CCDC134* são herdadas de forma autossômica recessiva, sendo necessários os dois alelos afetados para manifestações das características, se manifestando apenas em homozigose (DUBAIL *et al*, 2020; JOVANOVIC *et al*, 2021). A herança ligada ao cromossomo X foi identificada em variantes nos genes *MBTPS2* (LINDERT *et al*, 2016).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

A OI está entre as três displasias esqueléticas mais frequentemente diagnosticadas ao nascimento na América Latina (BARBOSA-BUCK *et al*, 2012).

A incidência mundial de OI é estimada para um a cada 10.000 ou 20.000 nascimentos (MARINI & DANG DO, 2020). No Brasil, segundo a Associação Nacional de Osteogênese Imperfeita (ANOI) estima-se que há mais de 12 mil casos no país (ANOI, 2012). Um estudo da Suécia estimou a prevalência dos tipos de OI com base em dados moleculares em uma população pediátrica, com prevalência de OI tipos I, III e IV foi calculada em 7,4 para 100.000 (LINDAHL *et al*, 2015).

2.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

A osteogênese imperfeita é uma displasia esquelética congênita rara caracterizada por fragilidade e deformidades ósseas, fraturas de repetição, platispondilia, escoliose, dor crônica e mobilidade limitada. Além disso, são comuns características não-esqueléticas, como a esclera azulada, dentinogênese imperfeita, perda auditiva, fraqueza muscular, frouxidão ligamentar e deficiências cardiorrespiratórias (HALD *et al*, 2018; MAROM *et al*, 2020). As manifestações clínicas se apresentam de diferentes maneiras entre os indivíduos, podendo apresentar desde quadros leves até letais, podendo o diagnóstico ser suspeitado intra-útero. Apresenta grande variabilidade clínica intra e interfamiliar, em que indivíduos com alterações genéticas semelhantes podem ter clínica distinta (ZHYTNIK *et al*, 2020).

2.3 CLASSIFICAÇÕES

Devido à variabilidade fenotípica e à heterogeneidade genética a OI pode ser classificada de duas formas: classificação clínica, de acordo com suas manifestações clínicas e radiológicas propostas inicialmente por David Sillence (1979); e classificação molecular, de acordo com a ordem cronológica de descoberta dos genes responsáveis por esta condição.

O diagnóstico molecular ainda não é acessível a todos os indivíduos devido ao seu alto custo (ZHYTNIK *et al*, 2020), sendo a classificação clínica a mais utilizada na prática clínica. Entretanto, a identificação molecular da OI é importante para o aconselhamento genético e no entendimento das vias que favorecem o desenvolvimento de novos tratamentos (JOVANOVIC *et al*, 2021).

2.3.1 Classificação Clínica

Em 1979 David Sillence identificou e classificou a OI em 4 tipos de acordo com os seus achados clínicos e radiológicos. Essa classificação abrange a gravidade da doença desde a forma mais leve até a forma perinatal letal. Com a análise molecular foi possível reconhecer os genes e tipo de herança desses 4 tipos estabelecidos por Sillence, sendo os genes *COL1A1* e *COL1A2* de herança autossômica dominante (MORTIER *et al*, 2019). O tipo V foi descrito e adicionado a classificação em 2000 por apresentar um novo fenótipo de OI causado por uma única mutação no gene *IFITM5* com herança autossômica dominante (GLORIEUX *et al*, 2000; BRIZOLA *et al*, 2015; MARINI *et al*, 2017).

A OI tipo I é descrita como uma forma leve e geralmente é identificada após os primeiros anos de vida quando a criança começa a deambular, tendo o seu pico de fraturas geralmente na fase de pré-puberdade diminuindo após a puberdade. Esse tipo de OI tem como características clínicas principais a fragilidade óssea, poucas fraturas, estatura em geral normal, esclera azulada, em alguns casos se observa compressão das vértebras e uma leve deformidade nos ossos longos. A OI tipo I é considerada o tipo mais frequente atingindo em torno de 50% dos casos (BRIZOLA *et al*, 2014; MARINI *et al*, 2017; MARINI & DANG DO, 2020).

OI tipo II é a forma letal, com múltiplas fraturas intra-útero, platispondilia, levando a óbito no período intra-uterino ou logo após o nascimento. Indivíduos que conseguem sobreviver ao nascimento geralmente apresentam grave deficiência respiratória o que os leva ao óbito no período neonatal. Além disso, esses indivíduos demonstram malformação do crânio, esclera azulada e deformidades graves principalmente dos membros inferiores e na caixa torácica (MARINI *et al*, 2017; MARINI & DANG DO, 2020).

OI tipo III é a forma mais grave não-letal ou progressivamente deformante. Indivíduos com esse tipo de OI geralmente vivem até a fase adulta mesmo com as limitações, ainda assim alguns indivíduos podem vir a sofrer com problemas respiratórios. A caracterização do tipo III se dá principalmente à baixa estatura grave, esclera azulada, dentinogênese imperfeita, encurtamento e deformidades nos ossos longos, escoliose, deformidades na caixa torácica e múltiplas fraturas ao longo da vida. Os ossos longos desses indivíduos apresentam deformidades graves, tensão do osso junto à musculatura normal, calcificações ósseas características e

recuperação lenta ou ineficiente após fraturas. Há também a ocorrência de perda auditiva que é mais frequente em adultos. Esses indivíduos podem apresentar importantes limitações motoras necessitando do auxílio de muletas e cadeiras de rodas para locomoção (MARINI *et al*, 2017; MARINI & DANG DO, 2020).

OI tipo IV é a forma moderada da patologia. Apresentam baixa estatura devido ao encurtamento dos membros inferiores, dentinogênese imperfeita, frouxidão ligamentar, deformidades ósseas e múltiplas fraturas que normalmente ocorrem na infância e na fase de pré-puberdade. Esses indivíduos também apresentam calcificações ósseas características devido à fraturas de repetição e alguns podem desenvolver escoliose devido à compressão das vértebras. Alguns indivíduos podem apresentar problemas na mobilidade (MARINI *et al*, 2017; MARINI & DANG DO, 2020).

A OI tipo V é uma forma moderada e corresponde a 3-5% dos casos. Assim como a OI tipo IV, a OI tipo V se caracteriza pela ocorrência de múltiplas fraturas, frouxidão ligamentar e deformidade moderada, porém com características distintas como presença de calo hiperplásico, calcificação da membrana interóssea entre rádio/ulna e tibia/fíbula e deslocamento da cabeça do rádio. Essas características podem levar a limitações na mobilidade dos membros, principalmente os superiores. Além disso, esse tipo de OI é causado por uma única variante c.-14C>T no gene *IFITM5* que leva ao ganho de função da proteína pela adição de 5 aminoácidos e consequentemente desencadeando uma hipermineralização (BRIZOLA *et al*, 2015; MARINI *et al*, 2017; MARINI & DANG DO, 2020).

2.3.2 Classificação Molecular

Ao longo dos anos foram sendo descobertos diversos genes envolvidos na biossíntese do colágeno tipo I e com isso a classificação clínica ou de Sillence já não comportava mais os diversos fenótipos e genes envolvidos na OI. Até o momento foram identificados 20 genes relacionados à OI, sendo eles responsáveis pela síntese, processamento e modelagem do colágeno tipo 1 (DUBAIL *et al*, 2020; CHETTY *et al*, 2021).

Esta classificação sugere que OI tipo I ao tipo IV ainda se utilize a classificação de Sillence sendo associadas aos genes *COL1A1* e *COL1A2* com base na apresentação clínica e achados radiológicos. O tipo V, é identificado com base em seus dados clínicos, mas também com base na análise genética (VAN DIJK & SILLENCE, 2014; CHETTY *et al*, 2021). Já os genes identificados posteriormente foram adquirindo sua numeração de acordo com a sua descoberta e registro no OMIM (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação molecular da osteogênese imperfeita de acordo com o OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*).

Tipo de OI	Gene	Herança	Fenótipo	Ação da proteína
I	<i>COL1A1</i>	AD	Leve	Síntese do colágeno
II	<i>COL1A1 / COL1A2</i>	AD	Letal	
		Mosaicismo parental		
III	<i>COL1A1 / COL1A2</i>	AD	Grave	
		Mosaicismo parental		
IV	<i>COL1A1 / COL1A2</i>	AD	Leve à Moderado	
		Mosaicismo parental		
V	<i>IFITM5</i>	AD	Grave	Mineralização
VI	<i>SERPINF1</i>	AR	Grave	

VII	<i>CRTAP</i>	AR	Grave	Modificação pós-traducional
VIII	<i>P3H1</i>	AR	Grave	
IX	<i>PIIB</i>	AR	Grave	
X	<i>SERPINH1</i>	AR	Grave	Enovelamento da tripla hélice e crosslink
XI	<i>FKBP10</i>	AR	Grave	
XII	<i>BMP1</i>	AR	Grave	Processamento do colágeno
XIII	<i>SP7</i>	AR	Grave	Diferenciação e maturação de osteoblastos
XIV	<i>TMEM38B</i>	AR	Grave	Fluxo de cálcio no retículo endoplasmático
XV	<i>WNT1</i>	AR/AD	Grave	Sinalização da via WNT
XVI	<i>CREB3L1</i>	AR	Grave	Transcrição de um fator envolvido na resposta de estresse celular
XVII	<i>SPARC</i>	AR	Grave	Processamento do colágeno
XVIII	<i>TENT5A</i>	AR	Grave	Formação óssea
XIX	<i>MBTPS2</i>	HLX	Grave	Coordenação de íons metálicos
XX	<i>MESD</i>	AR	Grave	Chaperona de receptores da via WNT
XXI	<i>KDEL2</i>	AR	Grave	Equilíbrio de pH no retículo endoplasmático
XXII	<i>CCDC134</i>	AR	Grave	Regulação de vias de sinalização

Legenda: AD - autossômico dominante; AR - autossômico recessivo; HLX: herança ligada ao X; Fonte: Elaboração própria.

A OI pode ser herdada por diferentes padrões de herança segundo o gene associado, autossômico dominante (*COL1A1*, *COL1A2* e *IFITM5*), autossômico recessiva (*SERPINF1*, *CRTAP*, *P3H1*, *PIIB*, *SERPINH1*, *FKBP10*, *SP7*, *BMP1*, *TMEMB38*, *WNT1*, *CREB3L1*, *SPARC*, *TENT5A*, *MESD*, *KDEL2* e *CCDC134*) e herança ligada ao cromossomo X (*MBTPS2*) (Tabela 1) (DUBAIL *et al*, 2020; JOVANOVIC *et al*, 2021).

Os genes *COL1A1* e *COL1A2* representam cerca de 80-85% dos casos de OI, enquanto o gene *IFITM5* corresponde a 3-5% dos casos e o restante dos genes

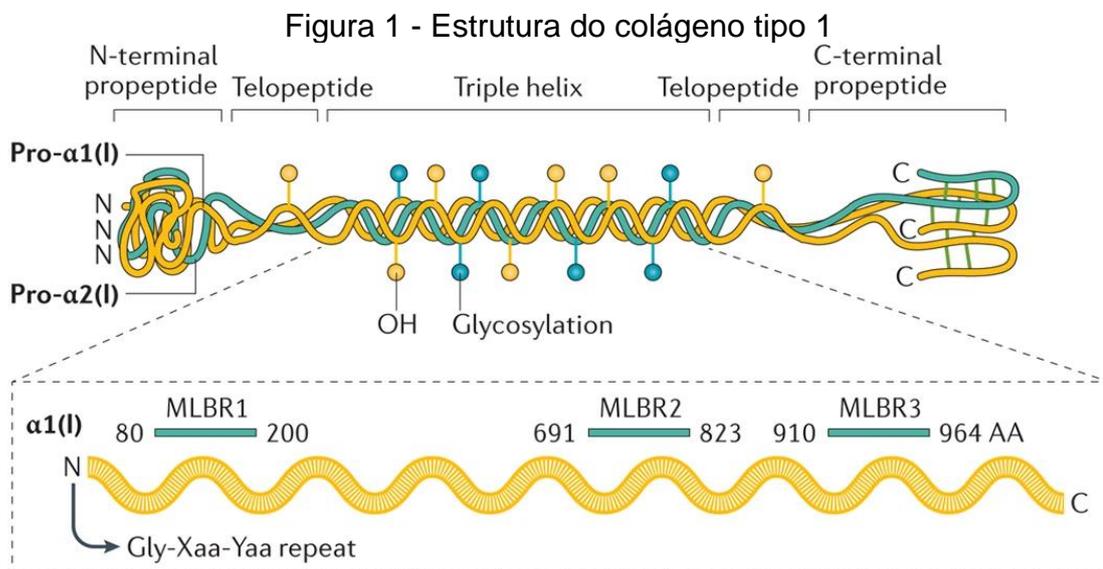
representam juntos cerca de 10%, sendo a frequência de cada um em torno de 1% ou menor (MARINI & DANG DO, 2020). Os genes *COL1A1* e *COL1A2* estão envolvidos diretamente na estrutura do colágeno tipo 1, ao mesmo tempo que os genes *CRTAP*, *P3H1*, *PIIB*, *FKBP10*, *SERPINH1*, *PLOD2* e *BMP1* estão envolvidos nas modificações pós traducionais e no processamento dessa proteína. Os genes *IFITM5*, *SERPINF1*, *TENT5A*, *TMEM38B* e *CCDC134* estão ligados ao desenvolvimento ósseo e mineralização, enquanto os genes *WNT1*, *CREB3L1*, *SP7*, *SPARC*, *MESD* e *MBTPS2* atuam na diferenciação e função dos osteoblastos (Tabela 1) (DUBAIL *et al*, 2020; JOVANOVIC *et al*, 2021; ALI *et al*, 2022).

2.4 BIOSÍNTESE DO COLÁGENO TIPO 1

O colágeno tipo 1 é a principal proteína constituinte do tecido ósseo que representa cerca de 90 a 95% da matriz óssea orgânica, além disso ele é encontrado na constituição de diversos tecidos e órgãos como pele, tecido conjuntivo, retina, esclera, dentina e pulmões (ZHYTNIK *et al*, 2020). Até chegar a sua estrutura final a proteína passa por uma série de processos.

2.4.1 Estrutura do colágeno

A estrutura do colágeno tipo 1 é um heterotrímero composto por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$, codificadas respectivamente pelos genes *COL1A1* e *COL1A2* (Figura 1). Essas cadeias de procolágeno são sintetizadas com duas regiões propeptídicas C-terminal e N-terminal que flanqueiam a tripla hélice. A região helicoidal é composta por 338 aminoácidos em cada uma das três cadeias α . Os aminoácidos se repetem em forma de trincas (Glicina-Xaa-Yaa), a glicina sempre se encontra na terceira posição e é fundamental para a formação da tripla hélice. As posições X e Y usualmente são ocupadas pela prolina e pela hidroxiprolina (HENRIKSEN & KARSDAL, 2019).



Nature Reviews | **Disease Primers**

Legenda: O colágeno tipo I é um heterotrímero composto de duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ que formam uma tripla hélice. As cadeias de procolágeno são sintetizadas contendo sequências de propeptídeos amino-terminais (N-terminal) e carboxil-terminais (C-terminal). A região helicoidal é composta por 338 aminoácidos em cada uma das três cadeias α . Os aminoácidos se repetem em forma de trincas (Glicina-Xaa-Yaa). Fonte: Marini, J.C. *et al*, 2017

2.4.1.1 Defeitos do colágeno tipo 1

Em torno de 1600 variantes já foram descritas apresentando alterações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, sendo a maior frequência no gene *COL1A1* (MARINI & DANG DO, 2020). Alterações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* levam a uma quantidade reduzida de colágeno (alteração quantitativa) ou a um colágeno com a estrutura anormal (alteração qualitativa).

Mutações quantitativas ou de haploinsuficiência estão relacionadas à uma redução na produção de colágeno, sendo que a proteína produzida tem estrutura normal. Causado por um alelo nulo em decorrência de variantes *nonsense*, *frameshift* e sítio de *splicing*, sendo a primeira mais frequente no gene *COL1A1*. Em geral, variantes que levam a defeito quantitativo na proteína estão associadas a fenótipos mais leves de OI (JOVANOVIC *et al*, 2021).

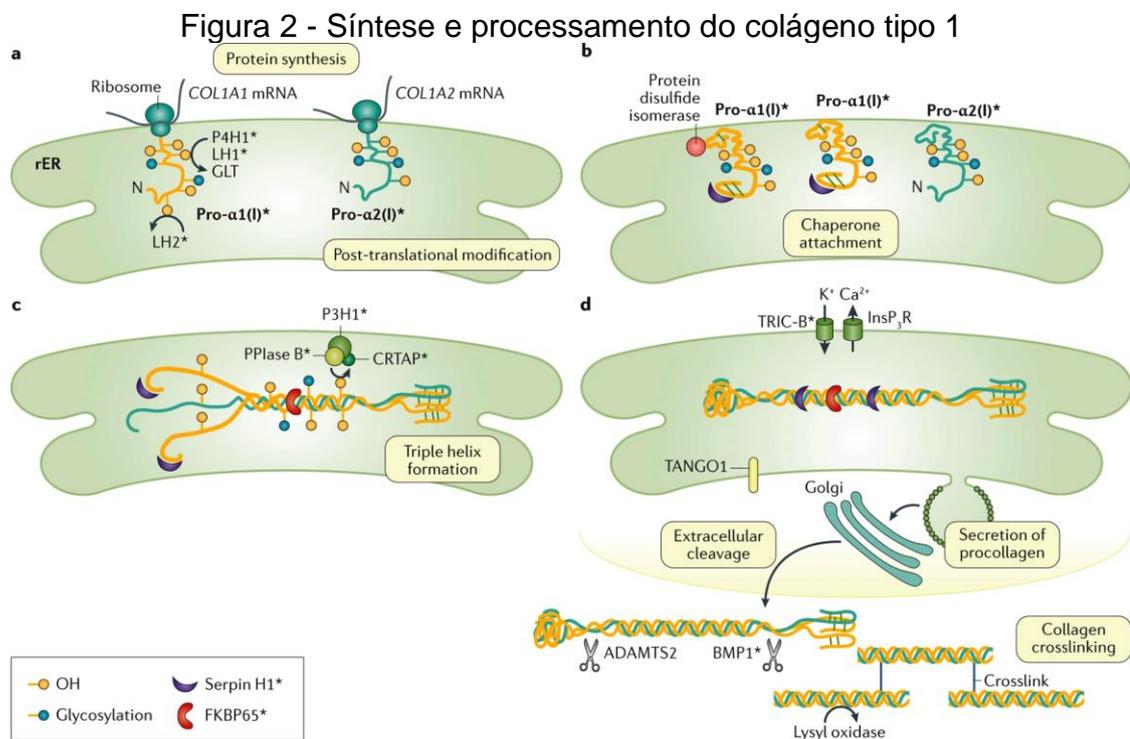
Mutações qualitativas ou estruturais estão relacionadas à uma produção de colágeno defeituoso onde há a troca de aminoácidos estruturais das cadeias pro α . Esse tipo de alteração interfere diretamente no enovelamento da tripla hélice e gera diversas modificações na proteína, principalmente na glicosilação. Na maioria dos casos é causada por variantes do tipo *missense*. Em 80% dos casos o defeito estrutural é a substituição de glicina por outro aminoácido, o que faz com que haja um atraso no enovelamento das cadeias e um prolongamento no tempo de ação de proteínas. Outro defeito estrutural importante que ocorre é o salto de exon, que pode afetar o enovelamento da proteína e abrange cerca de 20% dos defeitos estruturais. Defeitos podem ocorrer nas regiões C-terminal e T-terminal causando também um atraso no enovelamento da tripla hélice levando a múltiplas modificações pós-traducionais (MARINI *et al*, 2017; MARINI & DANG DO, 2020; JOVANOVIC *et al*, 2021).

A correlação entre genótipo e fenótipo ainda é incerta, mas estudos sugerem que o tipo de variante, a substituição de aminoácidos específicos, a cadeia e a posição em que se localiza a alteração contribuem para a manifestação clínica (MARINI *et al*, 2007). Alterações na região de tripla hélice da cadeia α 1 tendem a apresentar um fenótipo mais grave ou letal quando comparadas às alterações na cadeia α 2. Modelos animais de OI têm sido utilizados para a compreensão da fisiopatologia da doença e na adequação de tratamentos, mas ainda demonstram heterogeneidade no fenótipo (MARINI & DANG DO, 2020).

2.4.1.2 Modificações pós traducionais do colágeno tipo 1

As cadeias α 1 e α 2 passam por diversas modificações após a sua síntese, incluindo a hidroxilação das cadeias que é feita através de um complexo de proteínas sintetizadas por três genes: *CRTAP*, *P3H1* e *PPIB*. A ação desse complexo reflete diretamente na formação da fibrila e na função do tecido ósseo, principalmente através da hidroxilação de prolina e lisina, e posterior glicosilação dos resíduos desses

aminoácidos. O complexo age no retículo endoplasmático rugoso durante e após a síntese de cadeias pro- α do procolágeno tipo 1 (Figura 2). A proteína sintetizada pelo gene *P3H1* participa da hidroxilação de resíduos de prolina das cadeias de procolágeno contribuindo para o enovelamento, estabilidade e secreção de procolágeno. O gene *CRTAP* produz uma proteína (cartilage associated protein) que complementa a proli-3-hidroxilação, atuando mutuamente com o gene *P3H1* na hidroxilação da Pro986. A proteína CYPB ou peptidilisomerase B (*PPIB*) auxilia no enovelamento do procolágeno juntamente com as demais proteínas do complexo (YAMAUSHI *et al*, 2019).



Nature Reviews | Disease Primers

Legenda: a) Tradução e modificações pós-traducionais de pro- $\alpha 1(I)$ e pro- $\alpha 2(I)$. b) Interações de proteínas chaperonas para prevenir a formação prematura da tripla hélice. c) Formação da tripla hélice que compreende duas cadeias pro- $\alpha 1$ e uma cadeia pro- $\alpha 2$. d) Secreção do procolágeno e clivagem extracelular. Fonte: Marini, J.C. *et al*, 2017.

A hidroxilação das prolinas é fundamental para a estabilidade da formação da tripla hélice (YAMAUSHI *et al*, 2019). Mutações nos genes *PPIB* ou *CRTAP* podem afetar a ação de ambos já que eles atuam mutuamente no complexo, o que explica a semelhança observada no fenótipo dos indivíduos afetados com mutações nesses genes (CHANG *et al*, 2009). Além disso, a ação desses genes pode gerar uma super

modificação do colágeno ou retenção quando há atraso no enovelamento da tripla hélice (MARINI & DANG DO, 2020).

Defeitos nesse complexo podem levar a falhas na hidroxilação de prolínas e lisinas, glicosilação de hidroxiprolínas e no crosslinking da tripla hélice. O fenótipo observado em pacientes com mutações nesses genes varia de moderado a letal, já que há uma super modificação ao longo da região de tripla hélice do colágeno tipo I (PYOTT *et al*, 2011). Esses pacientes geralmente apresentam deformidades ósseas e múltiplas fraturas, esclera branca, baixa estatura, além do fato de pacientes com mutações nos genes *CRTAP* e *P3H1* demonstrarem rizomelia. Mutações no gene *CRTAP* levam à OI tipo VII, no gene *P3H1* à OI tipo VIII e no gene *PPIB* à OI tipo IX (MARINI & DANG DO, 2020).

2.4.1.3 Processamento, enovelamento e crosslink do colágeno tipo 1

Para o enovelamento e crosslink adequado dessa estrutura é fundamental a ação de proteínas chaperonas, HSP47 e FKBP65. Essas proteínas atuam também na estabilização da tripla hélice durante esse processamento pós traducional. As proteínas chaperonas atuam também no controle de qualidade na formação do colágeno tipo 1, elas são codificadas pelos genes *SERPINH1* (HSP47) e *FKBP10* (FKBP65) (Figura 2). Essas proteínas agem para impedir a formação prematura da fibrila. A lisil-hidroxilase 2 (LH2) é uma enzima catalisadora ligada à membrana retículo endoplasmático que age na hidroxilação de resíduos de lisina do telopeptídeo que estabilizam a molécula de colágeno tipo 1 para o crosslink, ela é codificada pelo gene *PLOD2* (PUIG-HERVÁS *et al*, 2012).

O fluxo intracelular do cálcio é importante para a maturação da molécula de colágeno e ocorre através de um canal cátion específico (TRIC-B), localizado na membrana do retículo endoplasmático, que também está envolvido na diferenciação celular. Esse canal é sintetizado pelo gene *TMEM38B* (figura 3). Dentre essas modificações há também a remoção dos propeptídeos N-terminal e C-terminal para a maturação da fibra de colágeno através da ação de proteínas de clivagem sintetizada pelo gene *BMP1* e *ADAMTS2* (MARINI *et al*, 2017).

Defeitos no gene *FKBP10* além de afetar o enovelamento da proteína também podem resultar em uma menor quantidade de colágeno na matriz extracelular e na redução da hidroxilação de lisinas, o que revela uma interação entre o produto desse gene e do *PLOD2*. Defeitos no gene *SERPINH1* podem levar ao atraso da síntese do

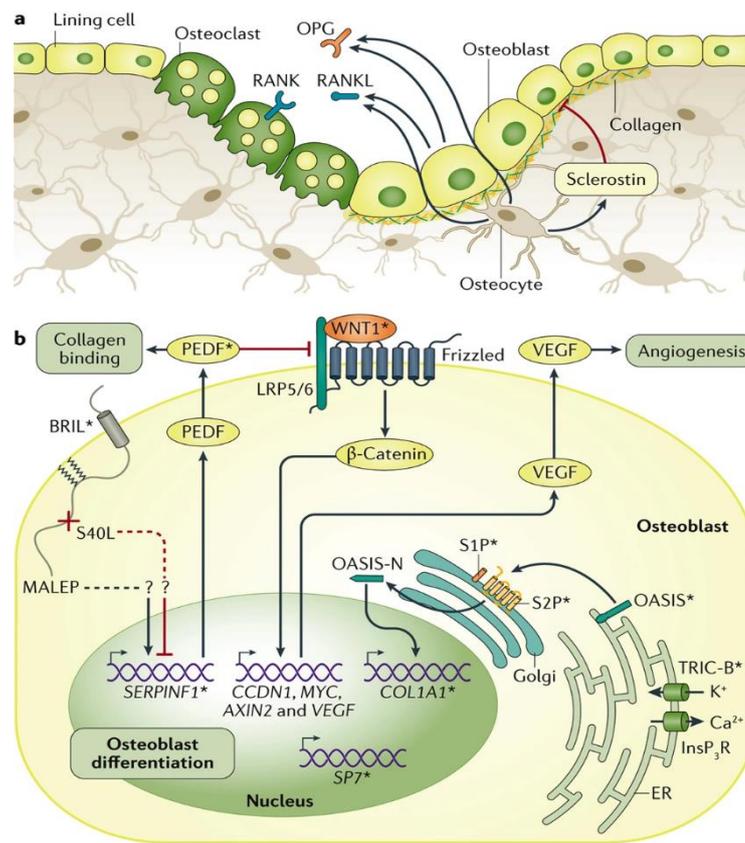
colágeno, agregação de colágeno intracelular e fibrilas anormais. Indivíduos com mutações no gene *FKBP10* apresentam OI tipo XI com fenótipos moderados a graves de OI com escleras normais, fraturas de ossos longos e baixa estatura; já em mutações no *SERPINH1* se observam casos de OI tipo X com fenótipo letal ou grave (FORLINO & MARINI, 2016; JOVANOVIC *et al*, 2021).

Defeitos no gene *BMP1* levam ao atraso ou defeito na maturação do colágeno, o que pode resultar em uma massa óssea elevada com fibrilas desorganizadas. Indivíduos com mutações nesse gene apresentam OI tipo XII com fenótipo variável, desde a forma leve até a forma grave, há evidências que a atividade residual de BMP1 possa influenciar na gravidade. Mutações no gene *TMEM38B* apresentam diversos problemas no processamento do colágeno tipo 1, já que o cálcio é um importante substrato durante as modificações pós-traducionais no colágeno. Defeitos nesse gene levam à OI tipo XIV que apresenta fenótipo leve à grave sendo observado hiper mineralização óssea, redução no número de osteoblastos e problemas no sistema cardiovascular (FORLINO & MARINI, 2016; JOVANOVIC *et al*, 2021).

2.4.1.4 Ossificação e mineralização óssea

A matriz óssea é composta por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), minerais e matriz orgânica (colágeno e proteoglicanos). A mineralização do osso ocorre através do fluxo de cálcio da corrente sanguínea e da liberação de fosfato de cálcio a partir da reabsorção da matriz óssea. A mineralização conta com a ação do gene *IFITM5* que secreta a proteína transmembrana induzida por interferon restrita aos ossos (BRIL), uma proteína de membrana dos osteoblastos, e o fator derivado do epitélio pigmentar (PEDF), uma proteína com propriedades antiangiogênicas secretada pelo gene *SERPINF1*. O BRIL tem ação conjunta com o PEDF na diferenciação osteoblástica e formação de osteóides (Figura 3) (JOVANOVIC *et al*, 2021).

Figura 3 - Diferenciação de osteoblastos e mineralização



Nature Reviews | Disease Primers

Legenda: a) Remodelação óssea b) Mineralização, sinalização e diferenciação osteoblástica. Fonte: MARINI *et al*, 2017

O primeiro defeito identificado no gene *IFITM5* foi a variante c.-14C>T, que se localiza na região 5'-UTR do gene. Esta alteração causa a adição de um novo códon

de iniciação com 5 aminoácidos na região N-terminal do BRIL (CHO *et al*, 2012). Essa mutação é conhecida por ser a única causa da OI tipo V, que apresenta fenótipo distinto das outras formas. Verificou-se a partir de análises que essa mutação gera um aumento na função da proteína BRIL, já que a proteína alongada apresenta estabilidade intracelular (PATOINE *et al*, 2014). O fenótipo de indivíduos com essa mutação inclui formação de calos hiperplásicos, escoliose, ossificação da membrana interóssea e descolamento da cabeça do rádio (HANAGATA, 2016). Além da variante comum causadora de OI tipo V, outra variante foi descrita no gene *IFITM5*, c.119C>T que causa uma troca de serina para leucina (p.Ser40Leu) e fenótipo semelhante a OI tipo VI (FARBER *et al*, 2014; GUILLÉN-NAVARRO *et al*, 2014). Recentemente foi descrita outra variante no mesmo codon p.Ser40Trp com fenótipo grave com fraturas intra uterinas, esclera azulada, deformidades ósseas e baixa estatura (LIM *et al*, 2019).

Além da redução da mineralização, mutações no gene *SERPINF1* por apresentarem redução na expressão da PEDF conseqüentemente demonstram aumento na quantidade de osteoblastos, já que ele também interfere na produção dessas células. Indivíduos com mutações nesse gene apresentam fenótipo grave com fraturas após o nascimento, frouxidão ligamentar e baixa estatura, além disso foi observado em histologia óssea um padrão de “escama de peixe” na lamela óssea, baixa mineralização e aumento dos osteóides (MARINI & DANG DO, 2020; JOVANOVIC *et al*, 2021).

2.4.1.5 Diferenciação e função dos osteoblastos

Os osteoclastos têm o papel de absorção óssea fazendo a renovação do tecido, fundamental para a formação óssea (Figura 3). A atividade dos osteoblastos é estimulada através da via WNT/ β -catenina, codificada pelo gene *WNT1* que também estimula a transcrição de genes envolvidos na diferenciação dos osteoblastos. Uma proteína chaperona (lipoproteína de baixa densidade ligada ao receptor) do retículo endoplasmático, codificada pelo gene *MESD*, age nos receptores (LRP5/6) da via Wnt (MOOSA *et al*, 2019). Um dos genes envolvidos diretamente na diferenciação e função dos osteoblastos é o *SP7* que codifica o osterix, que é um regulador transcricional na maturação dos osteoblastos (HOJO *et al*, 2016). Outro gene importante na formação óssea e na diferenciação dos osteoblastos é o *CREB3L1* que codifica uma substância especificamente induzida por astrócitos antigos (OASIS), responsável pela transcrição

de um fator envolvido na resposta de estresse celular na maturação de osteoblastos e por ativar o promotor do gene *COL1A1* (CAYAMI *et al*, 2019).

A proteína S1P regula diretamente a formação óssea atuando no controle de *pool* dos progenitores mesenquimais e na diferenciação osteoblástica, essa proteína é codificada pelo gene *MBTPS1*. Já a proteína codificada pelo gene *MBTPS2*, *S2P*, atua na coordenação dos íons de metais (JOVANOVIC *et al*, 2021). O gene *SPARC* produz a osteocina que age na calcificação do osso, síntese da matriz extracelular e na ativação e diferenciação celular de diversas células ósseas incluindo osteoblastos, células progenitoras da medula óssea, odontoblastos, células endoteliais, fibroblastos, pericitos, astrócitos e macrófagos (DURKIN *et al*, 2021).

Mutações no gene *WNT1* demonstram uma redução na ativação da via WNT que consequentemente afeta a regulação da diferenciação e função osteoblástica. Indivíduos com alterações nesse gene apresentam OI tipo XV caracterizada por um fenótipo moderado à grave e em alguns casos são observadas anormalidades neurológicas. Mutações no gene *CREB3L1* geram um acúmulo de substratos no retículo endoplasmático, que gera estresse celular e afeta na diferenciação osteoblástica. Indivíduos com mutações nesse gene apresentam OI tipo XVI que apresenta fenótipo grave à letal, com relatos de mortes intrauterinas. Os mecanismos moleculares dos genes *SP7*, *MESD* e *SPARC* ainda estão em estudo. Mutações no gene *SPARC* levam à OI tipo XVII e alterações no gene *SP7* levam à OI tipo VIII, ambos tipos com fenótipo moderado à grave. Mutações no gene *MESD* levam à OI tipo XX que apresenta fenótipo grave com deformidades ósseas e fraturas recorrentes (MARINI & DANG DO, 2020; JOVANOVIC *et al*, 2021).

2.4.1.6 Outros genes relacionados à OI

Outros genes envolvidos na formação óssea são *KDEL2* e *TENT5A* que respectivamente codificam o receptor de retenção de proteína do retículo KDEL endoplasmático e a proteína FAM46A. O receptor de retenção de proteína do retículo endoplasmático (*KDEL2*) atua no equilíbrio de pH intracelular facilitando a captação de proteínas do ambiente ácido do complexo de Golgi de volta ao retículo endoplasmático e está relacionado à OI tipo XXI (JOVANOVIC *et al*, 2021). A lisil hidroxilase 2 é uma enzima catalisadora ligada à membrana do retículo endoplasmático que age na hidroxilação de resíduos de lisina que estabilizam a molécula de colágeno tipo 1 para o crosslink (PUIG-HERVÁS *et al*, 2012). Estudos

preliminares sugerem que a proteína FAM46A tem ação crucial na sinalização celular e também se sabe que ela interage com fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que desempenha um papel importante no desenvolvimento ósseo e na homeostase (DOYARD *et al*, 2018). O gene *CDC134* codifica uma proteína amplamente expressa e implicada na regulação de algumas vias de sinalização de proteínas (DUBAIL *et al*, 2020; ALI *et al*, 2022).

2.5 OSTEOGÊNESE IMPERFEITA NO BRASIL

A Portaria no. 2305/2001 do Ministério da Saúde regulamentou as diretrizes para o tratamento da OI, e credenciou Centros de Tratamento em OI (CROI). Em 2013 foi aprovada a portaria nº 1306 que regulamentou novas diretrizes e protocolos clínicos com a adição de equipes multidisciplinares para o manejo e tratamento desses pacientes no SUS. No Brasil estão habilitados 14 CROIs distribuídos nos estados do país: São Paulo (Fundação Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Ambulatório de Fragilidades Ósseas e Hospital de Clínicas de São Paulo), Rio de Janeiro (Instituto Fernandes Figueira), Espírito Santo (Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória), Minas Gerais (Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia), Rio Grande do Sul (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), Santa Catarina (Hospital Infantil Joana Gusmão), Paraná (Hospital Infantil Pequeno Príncipe), Distrito Federal Ceará (Hospital Infantil Albert Sabin), Pernambuco (Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira) e Bahia (Hospital Universitário Professor Edgard Santos).

O único CROI do RS é o Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Desta forma, desde 2001 constituiu-se uma coorte de pacientes com OI em tratamento com pamidronato de sódio e outros bisfosfonatos, gerando dados epidemiológicos para futuros estudos. Até o momento no CROI-RS estão registrados 238 pacientes de 159 famílias não relacionadas o que oportunizou estudos em OI (BRIZOLA, STAUB e FÉLIX, 2014; ZAMBRANO *et al*, 2014; VANZ *et al*, 2015; ZAMBRANO *et al*, 2016; BRIZOLA *et al*, 2017; MAGALHÃES *et al*, 2018; VANZ *et al*, 2018; ZAMBRANO, FÉLIX e DE MELLO, 2018; PINHEIRO *et al*, 2019; ZAMBRANO, FÉLIX e MELLO, 2019; DA COSTA OTAVIO *et al*, 2020; PINHEIRO *et al*, 2020).

A partir de 2017 foi estabelecida a Rede Brasileira de Osteogênese Imperfeita (REBOI) com participação de 5 CROIs sob coordenação do HCPA, sendo registrados

mais de 260 pacientes. A REBOI tem como objetivo unir os dados dos CROIs e dar início aos estudos epidemiológicos para traçar o perfil da OI na população brasileira.

2.6 ESTUDOS SOBRE GENÉTICA DA OI NO BRASIL

Os estudos genéticos sobre OI no Brasil representam uma pequena parcela quando comparados às outras áreas de conhecimento relacionadas à OI. Grande parte dos estudos são relatos de casos ou apresentam pequeno número amostral, impossibilitando um delineamento epidemiológico do perfil genético da doença no país. Estudos tipo relato de caso único ou de um número pequeno de casos foram relatados relacionados ao diagnóstico molecular de OI (BARBIRATO *et al*, 2009; MORAES *et al*, 2012; MINILLO *et al*, 2014; BRIZOLA *et al*, 2015; DE SOUZA *et al*, 2021). Estudos como os de Reis *et al* (2005), Barbirato *et al* (2015), Barbirato *et al* (2016), Trancozo *et al* (2019) e Fernandes *et al* (2020) descrevem achados moleculares de um único centro trazendo informações iniciais de quais genes recessivos podem estar mais relacionados à OI no Brasil (Tabela 2).

Tabela 2 - Estudos genéticos da OI no Brasil

Autores	Origem	Nº de casos	Tipo de estudo	Genes
Reis <i>et al</i> (2005)	São Paulo	13	Transversal	100% COL1A1
Barbirato <i>et al</i> (2009)	Espírito Santo	1	Relato de caso	COL1A1
Moraes <i>et al</i> (2012)	Espírito Santo	11	Transversal	63,6% COL1A1
Minillo <i>et al</i> (2014)	São Paulo	4	Relato de casos	SERPINF1
Barbirato <i>et al</i> (2015)	Espírito Santo	25	Transversal	64% P3H1/CRTAP/PIIB
Brizola <i>et al</i> (2015)	Rio Grande do Sul Rio de Janeiro Pernambuco	7	Relato de casos	IFITM5

Barbirato <i>et al</i> (2016)	Espírito Santo	23	Transversal	39% <i>FKBP10/SERPINF1</i> <i>/SERPINH1</i>
Trancozo <i>et al</i> (2019)	Espírito Santo	30	Transversal	77% <i>COL1A1/COL1A2</i> 20% <i>FKBP10/P3H1</i>
Fernandes <i>et al</i> (2020)	São Paulo	38	Transversal	71% <i>COL1A1/COL1A2</i> 26% <i>FKBP10/PLOD2/SE</i> <i>RPINF1</i>
De Souza <i>et al</i> (2021)	Rio Grande do Sul	1	Relato de caso	<i>P3H1</i>

Fonte: Elaboração própria

3. JUSTIFICATIVA

A osteogênese imperfeita é uma doença rara com grande variabilidade fenotípica e é causada por defeitos em diversos genes. Estabelecer relação entre genótipo e fenótipo é um grande desafio levando em consideração que há variabilidade clínica inter e intrafamiliar. No Brasil ainda não existem dados epidemiológicos suficientes para o estabelecimento de incidência e do perfil da doença na população. Os estudos até então publicados na literatura sobre genética da OI na população brasileira são escassos e com pequeno número amostral.

A partir do estabelecimento da Rede Brasileira de Osteogênese Imperfeita foram cadastrados em torno de 260 pacientes com OI que compõem uma coorte onde estão reunidos dados clínicos e informações desses pacientes. Esse cadastro permite a realização de pesquisas com número amostral adequado e de relevância que propõem a evolução do atendimento e melhora do prognóstico desses pacientes.

O presente estudo é o primeiro deste tipo a ser realizado na população atendida pelos 5 CROIs cadastrados na REBOI visando uma melhor caracterização molecular da OI na nossa população. O diagnóstico molecular influencia no tratamento e no manejo desses pacientes. Os dados moleculares vão permitir o aconselhamento genético das famílias, trazendo esclarecimento e a possibilidade de prevenção de novos casos. Além disso, com a correlação genótipo-fenótipo será possível agregar dados para a caracterização do fenótipo da OI na população brasileira.

4. HIPÓTESES

A maioria dos casos estão associados a defeitos nos genes *COL1A1* e *COL1A2*.

Defeitos em genes de herança autossômica recessiva estão mais relacionados à consanguinidade do que defeitos em genes de herança autossômica dominante.

Defeitos qualitativos na proteína estão associados a fenótipos mais graves.

Defeitos quantitativos na proteína estão associados a fenótipos menos graves.

5. OBJETIVOS

5.1 GERAL

Identificar variantes patogênicas nos genes responsáveis pela biossíntese do colágeno tipo 1 em Osteogênese Imperfeita em uma coorte de pacientes brasileiros com OI.

5.2 ESPECÍFICOS

1. Pesquisar alterações em 18 genes associados à OI entre pacientes brasileiros através de um painel de sequenciamento de nova geração.
2. Descrever a incidência de alterações em genes associados com a OI em uma amostra da população brasileira.
3. Descrever correlação genótipo-fenótipo nesta população.

6. METODOLOGIA

6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal

6.2 LOCAL

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Medicina Genômica localizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

6.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Foram recrutados casos com OI de famílias não relacionadas registrados na Rede Brasileira de Osteogênese Imperfeita de 5 Centros de Referência para Tratamento de OI (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre (RS); Hospital Infantil Joana Gusmão, Florianópolis (SC); Instituto Fernandes Figueira, Rio de Janeiro (RJ); Hospital Infantil Albert Sabin, Fortaleza (CE) e Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Salvador (BA). Foram selecionados 1 caso por família para análise molecular inicial. A partir da identificação da alteração, outros membros da família também foram analisados quando disponível.

6.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS

6.4.1. Amostras de DNA

Amostras de sangue de indivíduos com OI foram coletadas e enviadas para extração de DNA e armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Medicina Genômica. O DNA foi extraído de células do sangue com o uso do kit de extração da Gentra Puregene e posteriormente quantificado no equipamento NanoDrop 1000 para avaliar a pureza do DNA antes da realização das análises moleculares.

6.4.2. Análise por sequenciamento de nova geração

O sequenciamento de nova geração é um teste genético capaz de analisar múltiplos genes e variantes ao mesmo tempo. No presente estudo foi utilizado um painel customizado de genes que inclui 18 genes identificados relacionados à OI. O painel foi desenhado utilizando o software Ion Ampliseq Designer e inclui as regiões codificantes e adjacentes dos genes *COL1A1*, *COL1A2*, *CRTAP*, *P3H1*, *PPIB*, *WNT1*, *TMEM38B*, *SERPINH1*, *BMP1*, *SP7*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SMPD3*, *CREB3L1*,

PLOD2, *P4HB*, *PLS3* e *IFITM5* e a região codificante 5' UTR do gene *IFITM5*. A análise inclui 3 *pools* com total de 319 amplicons com cobertura de 99,6% dos genes, sendo os genes *COL1A1* e *COL1A2* com 100% de cobertura.

As amostras de DNA foram purificadas e analisadas no equipamento Ion Torrent. A análise de bioinformática foi realizada usando o software Torrent Suite (versão 5.0; Thermo Fisher Scientific) para processar dados de sequenciamento, realizar alinhamento com a sequência referência e localizar variantes usando a sequência genômica de referência hg19 (Genoma Humano versão 19, UCSC) dos genes alvo conforme descrito. As variantes foram anotadas usando o software Ion Reporter (versão 5.0 e 5.12; Thermo Fisher Scientific) em um arquivo do tipo VCF (Variants called file) e filtradas de acordo com as frequências de alelos menores (MAF; menos de 1%), localização (regiões em éxon e sítio de *splicing*) e herança genética (dominante, recessivo ou ligado ao X). Os bancos de dados utilizados para verificação da descrição das variantes foram ABraOM (variantes genômicas brasileiras) dbSNP-NCBI, ClinVar-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e banco de dados de variantes de Osteogênese Imperfeita -LOVD v2.0 (<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>). As variantes que não foram relatadas nesses bancos de dados foram avaliadas em preditores *in silico*: SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), Polyphen-2 (<http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), PredictSNP (<http://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp>) e Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>). As variantes foram visualizadas no software Integrative Genome Viewer (IGV) a fim de avaliar a profundidade e qualidade da sequência sequenciada.

As variantes identificadas nos genes *COL1A1* e *COL1A2* foram classificadas de acordo com o efeito na proteína de colágeno tipo I como defeitos quantitativos ou qualitativos. Variantes em sítio de *splicing*, inserções, deleções, INDEL (inserção+deleção), *frameshifts* e códon de parada prematuros foram classificadas como quantitativos. Já os defeitos qualitativos foram categorizados em variantes que causam substituições de aminoácidos (*missense*) ou uma duplicação de aminoácidos.

6.4.3. Sequenciamento por Sanger

As variantes identificadas no NGS foram confirmadas através do sequenciamento por eletroforese capilar de Sanger que é considerado padrão ouro para esse tipo de diagnóstico. O DNA do paciente e, quando possível, de seus pais

foram analisados apenas para a respectiva variante identificada para análise de segregação.

Para o sequenciamento, *primers* específicos foram desenhados com auxílio da plataforma *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Após a reação de PCR e a visualização em gel de agarose 2%, os amplicons foram purificados utilizando enzimas (Exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase*) e, a seguir, a reação de sequenciamento foi preparada na Unidade de Pesquisa Laboratorial (UPL) do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA e a eletroforese capilar realizada no analisador genético ABI 3500 (Applied Biosystems). Para interpretação dos resultados de sequenciamento foram utilizados os programas FinchTV (versão 1.4) e Bioedit. Todas as alterações de sequência foram confirmadas em ambas as fitas de DNA.

6.4.4. Dados clínicos

Os dados clínicos foram obtidos através de um formulário padrão, contendo os seguintes campos: sexo, data de nascimento, altura, história familiar, esclera azul e dentinogênese imperfeita. A altura foi convertida em z-scores específicos para idade e sexo usando a ferramenta da Organização Mundial da Saúde (AnthroPlus).

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no programa IBM SPSS Statistics versão 27.0 para Windows. Para testar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram apresentados por meio de distribuições absoluta e relativa. Os testes qui-quadrado de Pearson, exato de Fisher e teste U de Mann Whitney foram usados para comparar os defeitos na proteína nos genes *COL1A1* e *COL1A2* com as informações clínicas.

A comparação de variáveis qualitativas (gênero, dentinogênese imperfeita, esclera azulada, gravidade do fenótipo, tipo de OI e história familiar) com o tipo de defeito na proteína foi realizada através dos testes de qui-quadrado de Pearson e exato de Fisher. Já a comparação de variáveis quantitativas (estatura e escore z de estatura) foi realizada através do teste U de Mann Whitney. Foram considerados significativos valores de $p < 0,001$.

6.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (CAAE 47277215.8.1001.5327), centro coordenador do estudo sob número: 2015-0632, e também nos Centros participantes.

Todos os pacientes e/ou responsáveis assinaram termo de consentimento livre e esclarecido específico para participação no estudo (Apêndices A, B e C).

REFERÊNCIAS

- ALI, T.M. *et al.* The recurrent homozygous translation start site variant in *CCDC134* in an individual with severe osteogenesis imperfecta of non-Moroccan ancestry. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v.188, n.5, p.1545-1549, 2022.
- BARBIRATO, C. *et al.* A novel *COL1A1* gene-splicing mutation (c.1875+1G>C) in a Brazilian patient with osteogenesis imperfecta. **Genetic Molecular Research**. v.8, n.1, p.173-8, 2009.
- BARBIRATO, C. *et al.* Analysis of *FKBP10*, *SERPINH1*, and *SERPINF1* genes in patients with osteogenesis imperfecta. **Genetic Molecular Research**; v.15, n.3, 2016.
- BARBIRATO, C. *et al.* Mutational characterization of the *P3H1/CRTAP/CypB* complex in recessive osteogenesis imperfecta. **Genetic Molecular Research**; 2015 Dec 3 ;v.14, n.4, p.15848-58, 2015.
- BARBOSA-BUCK, C.O.; ORIOLI, I.M.; DUTRA, M.G.; LOPEZ-CAMELO, J.; CASTILLA, E.E.; CAVALCANTI, D.P. Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 158, n. 5, p. 1038-1045, 2012.
- BRIZOLA, E. *et al.* Clinical and molecular characterization of osteogenesis imperfecta type V. **Molecular Syndromology**; v.6, n.4, p.164-72, 2015.
- BRIZOLA, E. *et al.* Clinical features and pattern of fractures at the time of diagnosis of osteogenesis imperfecta in children. **Revista Paulista de Pediatria**. v.35, n.2, p.171-177, 2017.
- BRIZOLA, E.; STAUB, A.L.; FÉLIX, T.M. Muscle strength, joint range of motion, and gait in children and adolescents with osteogenesis imperfecta. **Pediatric Physical Therapy**. v.26, n.2, p.245-52, 2014.
- CAYAMI, F. K. *et al.* (2019). The first family with adult osteogenesis imperfecta caused by a novel homozygous mutation in *CREB3L1*. **Molecular genetics & genomic medicine**. v. 7, i. 8, e823, 2019.
- CHANG, W.; BARNES, A.M.; CABRAL, W.A.; BODURTHA, J.N.; MARINI, J.C. Prolyl 3-hydroxylase 1 and *CRTAP* are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex. **Human Molecular Genetics**. v. 19, n. 2, p. 223-34, 2010.
- CHETTY, M.; ROOMANEY, I.A.; BEIGHTON, P. The evolution of the nosology of osteogenesis imperfecta. **Clinical Genetics**. v. 99, n. 1, p. 42-52, 2021.
- CHO, T.J. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* causes osteogenesis imperfecta type V. **American Journal of Human Genetics**. v. 91, n. 2, p. 343-8, 2012.

DA COSTA, Otavio A.C. *et al.* Osteogenesis imperfecta and hearing loss: an analysis of patients attended at a benchmark treatment center in southern Brazil. **European Archives of Otorhinolaryngology**. v.277, n.4, n.1005-1012, 2020.

DE SOUZA, L.T. *et al.* A new case of osteogenesis imperfecta type VIII and retinal detachment. **American Journal of Medical Genetics Part A**. 2021 Jan;v.185, n.1, p.238-241, 2021.

DOYARD, M. *et al.* *FAM46A* mutations are responsible for autosomal recessive osteogenesis imperfecta. **Journal of Medical Genetics**. v. 55, n. 4, p. 278-284, 2018.

DUBAIL, J. *et al.* Homozygous loss-of-function mutations in *CCDC134* are responsible for a severe form of osteogenesis imperfecta. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.35, p.1470-1480, 2020.

DURKIN, A. *et al.* Expanding the phenotype of *SPARC*-related osteogenesis imperfecta: clinical findings in two patients with pathogenic variants in *SPARC* and literature review. **Journal of Medical Genetics**. 2021. Epub ahead of print.

EL-GAZZAR, A.; HÖGLER, W. Mechanisms of bone fragility: from osteogenesis imperfecta to secondary osteoporosis. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 2, p.625, 2021.

ETICH, J. *et al.* Osteogenesis imperfecta-pathophysiology and therapeutic options. **Molecular Cellular Pediatrics**. v. 7, n. 1, p. 9, 2020.

FARBER, C.R. *et al.* A novel *IFITM5* mutation in severe atypical osteogenesis imperfecta type VI impairs osteoblast production of pigment epithelium-derived factor. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**. v.29, n.6, p.1402-11, 2014.

FERNANDES, A.M. *et al.* The molecular landscape of osteogenesis imperfecta in a Brazilian tertiary service cohort. **Osteoporosis International**. v.31, n.7, p.1341-1352, 2020.

GUILLÉN-NAVARRO, E. *et al.* Two mutations in *IFITM5* causing distinct forms of osteogenesis imperfecta. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v.164A, n. 5, p. 1136-42, 2014.

HANAGATA, N. *IFITM5* mutations and osteogenesis imperfecta. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**. v. 34, n. 2, p. 123-31, 2016.

HENRIKSEN, K.; KARSDAL, M.A. Chapter 1 - type I collagen. **Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin (Second Edition)**, Academic Press. v. 2, p.1-12, 2019.

HOJO, H.; OHBA, S.; HE, X.; LAI, L.P.; MCMAHON, A.P. Sp7/Osterix is restricted to bone-forming vertebrates where it acts as a Dlx co-factor in osteoblast specification. **Developmental Cell**. v. 37, n. 3, p. 238-53, 2016.

JOVANOVIC, M.; GUTERMAN-RAM, G.; MARINI, J.C. Osteogenesis imperfecta: mechanisms and signaling pathways connecting classical and rare OI types. **Endocrine Reviews**. Epub ahead of print, 2021.

LIM, J.Y. *et al.* A novel Ser40Trp variant in *IFITM5* in a family with osteogenesis imperfecta and review of the literature. **Clinical Dysmorphology**. v. 28, n. 3, p. 120-125, 2019.

LINDAHL, K. *et al.* Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. **European Journal of Human Genetics**. v. 23, n. 8, p. 1042-50, 2015.

LINDERT, U.; *et al.* *MBTPS2* mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta. **Nature communications**. v.7, 11920, 2016.

MAGALHAES, O.A. *et al.* Collagen I defect corneal profiles in osteogenesis imperfecta. **Cornea**. v.37, n.12, p.1561-1565, 2018.

MARINI, J. C. *et al.* Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. **Human Mutation**. v. 28, n. 3, p. 209–221, 2007.

MARINI, J.C. *et al.* Osteogenesis imperfecta. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 3, 2017.

MARINI, J.C.; DANG DO, A.N. Osteogenesis imperfecta. **FEINGOLD K.R. et al editors**. Endotext [Internet], South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2020.

MINILLO, R.M. *et al.* Novel deletion of *SERPINF1* causes autosomal recessive osteogenesis imperfecta type VI in two Brazilian families. **Molecular Syndromology**; v.5, n.6, p.268-75, 2014.

MOOSA, S. *et al.* Autosomal-recessive mutations in *MESD* cause osteogenesis imperfecta. **American Journal of Human Genetics**. v. 105, n. 4, p. 836-843, 2019.

MORAES, M.V. *et al.* Variable expressivity of osteogenesis imperfecta in a Brazilian family due to p.G1079S mutation in the *COL1A1* gene. **Genetic Molecular Research**; v.11, n.3, p.3246-55, 2012.

MORTIER, G.R. *et al.* Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. **American Journal of Medical Genetics A**. v. 179, n. 12, p. 2393-2419, 2019.

NICOL, L. *et al.* Alterations in non-type I collagen biomarkers in osteogenesis imperfecta. **Bone**. v. 120, p. 70-74, 2019.

PATOINE, A.; GAUMOND, M.H.; JAISWAL, P.K.; FASSIER, F.; RAUCH, F.; MOFFATT, P. Topological mapping of BRIL reveals a type II orientation and effects of osteogenesis imperfecta mutations on its cellular destination. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 29, n. 9, p. 2004-16, 2014.

PINHEIRO, B. *et al.* Cyclic pamidronate treatment for osteogenesis imperfecta: report from a Brazilian reference center. **Genetics and Molecular Biology**. v.42, n.1 suppl 1, p.252-260, 2019.

PINHEIRO, B.S. *et al.* Echocardiographic study in children with osteogenesis imperfecta. **Cardiology in the Young**. v.30, n.10, p.1490-1495, 2020.

PUIG-HERVÁS, M.T. *et al.* Mutations in *PLOD2* cause autosomal-recessive connective tissue disorders within the Bruck syndrome-osteogenesis imperfecta phenotypic spectrum. **Human Mutation**. v. 33, n. 10, p. 1444–1449, 2012.

PYOTT, S. M. *et al.* Mutations in *PPIB* (cyclophilin B) delay type I procollagen chain association and result in perinatal lethal to moderate osteogenesis imperfecta phenotypes. **Human Molecular Genetics**. v. 20, n. 8, p. 1595-609, 2011.

REIS, F.C.; ALEXANDRINO, F.; STEINER, C.E.; NORATO, D.Y.; CAVALCANTI, D.P.; SARTORATO, E.L. Molecular findings in Brazilian patients with osteogenesis imperfecta. **Journal of Applied Genetics**. v. 46, n. 1, p. 105-8, 2005.

ROSSI, V.; LEE, B.; MAROM, R. Osteogenesis imperfecta: advancements in genetics and treatment. **Current Opinion in Pediatrics**. v. 31, n. 6, p. 708-715, 2019.

TRANCOZO, M. *et al.* Osteogenesis imperfecta in Brazilian patients. **Genetic Molecular Biology**. v.42, n.2, p.344-350, 2019.

VAN DIJK, F.S. *et al.* Interaction between *KDELR2* and *HSP47* as a key determinant in osteogenesis imperfecta caused by bi-allelic variants in *KDELR2*. **American Journal of Human Genetics**. v. 5, n. 107, p. 989-999, 2020.

VAN DIJK, F.S.; SILLENCE, D.O. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 164A, n. 6, p. 1470-81, 2014.

VANZ, A.P. *et al.* Health-related quality of life of children and adolescents with osteogenesis imperfecta: a cross-sectional study using PedsQL™. **BMC Pediatrics**. v.18, n.1, p.95, 2018.

VANZ, A.P. *et al.* Quality of life in caregivers of children and adolescents with Osteogenesis Imperfecta. **Health and Quality of Life Outcomes**. v.13, p.41, 2015.

YAMAUCHI, M.; SRICHOLPECH, M. Lysine post-translational modifications of collagen. **Essays Biochemistry**. v. 52, p. 113-33, 2012.

YAMAUCHI, M.; SRICHOLPECH, M.; TERAJIMA, M.; TOMER, K.B.; PERDIVARA, I. Glycosylation of type I collagen. **Methods in Molecular Biology**. v. 1934, p. 127-144, 2019.

ZAMBRANO, M,B. *et al.* Anthropometry, nutritional status, and dietary intake in pediatric patients with osteogenesis imperfecta. **Journal of the American College of Nutrition**. v.33, n.1, p.18-25, 2014.

ZAMBRANO, M.B. *et al.* Study of the determinants of vitamin D status in pediatric patients with osteogenesis imperfecta. **Journal of the American College of Nutrition**. v.35, n.4, p.339-45, 2016.

ZAMBRANO, M.B.; FÉLIX, T.M.; DE MELLO, E.D. Difference between methods for estimation of basal metabolic rate and body composition in pediatric patients with osteogenesis imperfecta. **Annals of Nutrition and Metabolism**. v.72, n.1, p.21-29, 2018.

ZAMBRANO, M.B.; FÉLIX, T.M.; MELLO, E.D. Calcium intake improvement after nutritional intervention in pediatric patients with osteogenesis imperfecta. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. v.32, n.5, p.619-624, 2019.

ZHYTNIK, L.; SIMM, K.; SALUMETS, A.; PETERS, M.; MÄRTSON, A.; MAASALU, K. Reproductive options for families at risk of osteogenesis imperfecta: a review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. v. 15, n. 1, p.128, 2020.

7. RESULTADOS

7.1 ARTIGO 1 - Genetic analysis of Osteogenesis Imperfecta in a large Brazilian cohort

O artigo resultante desse trabalho será submetido na revista Bone que possui fator de impacto de 4,983. A Bone aborda artigos originais e revisões sobre aspectos básicos, translacionais e clínicos do metabolismo mineral e ósseo. Diversos estudos sobre osteogênese imperfeita já foram publicados nesta revista, desde a abordagem genética até a clínica.

8. CONCLUSÕES

O diagnóstico molecular de OI desempenha um papel importante para o entendimento da fisiopatologia e aconselhamento genético. O presente estudo permitiu identificar variantes patogênicas relacionadas à OI em 77,6% dos casos analisados. As variantes foram inicialmente identificadas através de um painel de sequenciamento de nova geração, e quando necessário, foram confirmadas através do sequenciamento de Sanger. Dentre essas variantes, 88,4% estavam presentes nos genes *COL1A1* e *COL1A2* e 11,6% nos demais genes relacionados à OI, resultados semelhantes a outros observados na literatura. A identificação de variantes neste estudo levou à descoberta de 25 alterações em diferentes genes que ainda não haviam sido descritas na literatura, demonstrando a importância do uso e da aplicabilidade do painel de sequenciamento de nova geração. O uso do NGS também possibilitou o diagnóstico de 77,6% da amostra, uma taxa significativa para doenças como a OI que pode ser causada por variantes em diversos genes.

Com relação à associação genótipo-fenótipo em casos de alterações dos genes *COL1A1* e *COL1A2*, foi possível observar que indivíduos que possuíam variantes quantitativas tendem a demonstrar um fenótipo mais leve, enquanto variantes qualitativas se associam à fenótipos mais graves, dado já observado anteriormente na literatura. A taxa de consanguinidade entre os casos recessivos é similar a outros estudos feitos no país, inclusive de outras patologias genéticas, que demonstram essa alta principalmente em regiões mais remotas. Levando em consideração a alta taxa de consanguinidade e casos como os identificados neste estudo no gene *FKBP10*, em que se observa a mesma variante em indivíduos não relacionados de uma mesma região geográfica, conclui-se que há a necessidade de ampliar a investigação devido ao possível efeito fundador que pode ter levado à essa concentração de casos.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Patologias como a OI que estão ligadas a diversos genes envolvem uma investigação minuciosa, bem planejada e criteriosa. No Brasil, a utilização de um laboratório centralizado para realizar o diagnóstico molecular, estabelecendo protocolos para testes moleculares, agiliza os resultados e ajuda a conhecer o perfil genético da população brasileira de OI. Estudos com grandes coortes permitem a associação de fatores genéticos ao fenótipo, compreender a fisiopatologia da OI, além de trazer a possibilidade de aconselhamento genético para as famílias afetadas. Os resultados deste estudo foram semelhantes a outras populações estudadas, porém algumas variantes descritas apenas em nossa população ou isoladas requerem estudos adicionais. Em alguns casos identificamos variantes semelhantes e de herança autossômica recessiva em indivíduos não relacionados em uma mesma região geográfica levando ao questionamento de um possível efeito fundador o que deverá ser explorado em estudos futuros.

O presente estudo levantou questionamentos para que sejam realizadas mais pesquisas genéticas na população brasileira com relação às variantes identificadas em genes de herança autossômica recessiva, onde a taxa de consanguinidade foi mais elevada e a possibilidade de efeito fundador foi levantada. Além disso, há necessidade de continuar a investigar os demais casos em que não foi possível identificar a variante associada à patologia pela metodologia usada neste estudo.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os Pais do Paciente

Vocês, pais, e seu filho (a) estão sendo convidados a participar do projeto de pesquisa “Rede Brasileira de Osteogênese Imperfeita”. Este projeto pretende estruturar uma rede nacional organizada de referência para investigação, diagnóstico e tratamento da osteogênese imperfeita (OI) no Brasil. O projeto será realizado em colaboração com centros de referência para tratamento de OI de diferentes estados brasileiros.

Um dos objetivos deste projeto é implementar um registro de osteogênese imperfeita no Brasil. Atualmente, não há dados nacionais disponíveis sobre o número de casos atendidos nos centros de referência, tipo de terapia utilizada e resultados do tratamento. Esta base de dados pertencerá à Rede Brasileira de Osteogênese Imperfeita, que tem sua coordenação localizada no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Ao aceitar participar, será preenchido um formulário com informações médicas de seu filho (a) bem como de sua família. Dados clínicos como estatura, peso e deformidades ósseas serão anotados. Dados de exames realizados rotineiramente como raio x, densitometria óssea e exames cardiológicos serão coletados para este estudo. Fotografias poderão ser realizadas no decorrer do estudo.

O potencial desconforto da participação nesta etapa do estudo é apenas o tempo necessário para o preenchimento do formulário, que ocorrerá durante a consulta médica de rotina (cerca de 30 minutos).

Estas informações poderão não trazer benefícios diretos para vocês, seu filho (a) neste momento, mas o conhecimento acumulado sobre todos os indivíduos participantes, assim como, sobre o uso de medicamentos, o desenvolvimento físico e mental e os aspectos, clínicos, cirúrgicos e genéticos, ajudará os profissionais que atendem pacientes com osteogênese imperfeita a melhorar o tratamento dispensado.

Nesta base de dados, também está prevista a criação de um repositório de material genético (DNA), que será usado para investigação de causas genéticas da OI. Este material será armazenado no Serviço de Genética Médica do HCPA, em condições apropriadas e ficará disponível para os pesquisadores dos hospitais participantes deste projeto.

Por isso, vocês, pais, e seu filho (a) estão sendo convidados a realizar uma coleta de 5mL de sangue (cerca de uma colher de chá) para extração de DNA. A partir do sangue coletado serão realizadas análises laboratoriais que permitirão verificar características genéticas associadas à osteogênese imperfeita. O material coletado será armazenado de forma codificada. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos relacionados a OI. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa institucional e, se for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, e você será chamado para reconseguir com o uso do material.

Os potenciais riscos para esta etapa do estudo estão relacionados à coleta do material biológico. A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado, mas pode ocasionar dor e manchas roxa no local que desaparecem em poucos dias.

Esta base de dados não trará informações diretas para o atendimento de seu filho (a). Entretanto, quando os testes genéticos realizados detectarem informações que possam ser importantes para ele (a) e/ou para a família, estas informações serão repassadas a você e vocês receberão aconselhamento.

Vocês poderão solicitar a retirada das informações e do material genético a qualquer momento, bastando solicitar por escrito ao responsável pelo projeto.

Os pesquisadores se comprometem a manter a confidencialidade de dados de identificação pessoal dos participantes, incluindo as fotografias, e os resultados serão divulgados de maneira agrupada sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

A participação no estudo é totalmente voluntária. A não participação ou desistência após ingressar no estudo não implicará em nenhum tipo de prejuízo ao atendimento que recebem ou venham a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e os participantes não terão nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida antes e durante o curso do estudo com Dra. Têmis Maria Félix, pesquisadora responsável, pelo telefone (51) 33598011.

O Comitê de Ética em Pesquisa poderá ser contatado para esclarecimento de dúvidas, no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone (51) 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

Este termo foi elaborado em duas vias, sendo que uma delas entregue ao participante e a outra mantida com o grupo de pesquisadores.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, potenciais benefícios, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar:

() Concordo em participar e autorizo a participação do meu filho (a) no presente estudo apenas na coleta de informações e fotografias para a base de dados clínicos e familiares , sem coleta de material biológico (sangue).

() Concordo em participar e autorizo a participação do meu filho (a) no presente estudo na coleta de informações e fotografias para a base de dados clínicos e familiares e com coleta de material biológico (sangue).

() Concordo em participar e autorizo a participação do meu filho (a) no presente estudo na coleta de informações e fotografias para a base de dados clínicos e familiares e com coleta de material biológico (sangue) e armazenamento para uso em pesquisas futuras.

Nome do paciente: _____

Assinatura: _____

(Se aplicável)

Nome da mãe: _____

Assinatura: _____

Nome do pai: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Paciente Maior de Idade

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “Rede Brasileira de Osteogênese Imperfeita”. Este projeto pretende estruturar uma rede nacional organizada de referência para investigação, diagnóstico e tratamento da osteogênese imperfeita (OI) no Brasil. O projeto será realizado em colaboração com centros de referência para tratamento de OI de diferentes estados brasileiros.

Um dos objetivos deste projeto é implementar um registro de osteogênese imperfeita no Brasil. Atualmente, não há dados nacionais disponíveis sobre o número de casos atendidos nos centros de referência, tipo de terapia utilizada e resultados do tratamento. Esta base de dados pertencerá à Rede Brasileira de Osteogênese Imperfeita, que tem sua coordenação localizada no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Ao aceitar participar, será preenchido um formulário com informações médicas suas bem como de sua família. Dados clínicos como estatura, peso e deformidades ósseas serão anotados. Dados de exames realizados rotineiramente como raio x, densitometria óssea e exames cardiológicos serão coletados para este estudo. Fotografias poderão ser realizadas no decorrer do estudo.

O potencial desconforto da participação nesta etapa do estudo é apenas o tempo necessário para o preenchimento do formulário, que ocorrerá durante a consulta médica de rotina (cerca de 30 minutos).

Estas informações poderão não trazer benefícios diretos para você neste momento, mas o conhecimento acumulado sobre todos os indivíduos participantes, assim como, sobre o uso de medicamentos, o desenvolvimento físico e mental e os aspectos, clínicos, cirúrgicos e genéticos, ajudará os profissionais que atendem pacientes com osteogênese imperfeita a melhorar o tratamento dispensado.

Nesta base de dados, também está prevista a criação de um repositório de material genético (DNA), que será usado para investigação de causas genéticas da OI. Este material será armazenado no Serviço de Genética Médica do HCPA, em condições apropriadas e ficará disponível para os pesquisadores dos hospitais participantes deste projeto.

Por isso, você está sendo convidado a realizar uma coleta de 5mL de sangue (cerca de uma colher de chá) para extração do DNA. A partir do sangue coletado serão

realizadas análises laboratoriais que permitirão verificar características genéticas associadas à osteogênese imperfeita. O material coletado será armazenado de forma codificada. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos relacionados a OI. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa institucional e, se for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, e você será chamado para reconseguir com o uso do material.

Os potenciais riscos para esta etapa do estudo estão relacionados à coleta do material biológico. A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado, mas pode ocasionar dor e manchas roxa no local que desaparecem em poucos dias.

Esta base de dados não trará informações diretas para o seu atendimento. Entretanto, quando os testes genéticos realizados detectarem informações que possam ser importantes para você, estas informações serão repassadas a você e você receberá aconselhamento.

Você poderá solicitar a retirada das informações e do material genético a qualquer momento, bastando solicitar por escrito ao responsável pelo projeto.

Os pesquisadores se comprometem a manter a confidencialidade de dados de identificação pessoal dos participantes, incluindo as fotografias, e os resultados serão divulgados de maneira agrupada sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

A participação no estudo é totalmente voluntária. A não participação ou desistência após ingressar no estudo não implicará em nenhum tipo de prejuízo ao atendimento que você recebe ou venha a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e os participantes não terão nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida antes e durante o curso do estudo com Dra. Têmis Maria Félix, pesquisadora responsável, pelo telefone (51) 33598011.

O Comitê de Ética em Pesquisa poderá ser contatado para esclarecimento de dúvidas, no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone (51) 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

Este termo foi elaborado em duas vias, sendo que uma delas entregue ao participante e a outra mantida com o grupo de pesquisadores.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, potenciais benefícios, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar:

() Concordo em participar no presente estudo apenas na coleta de informações e fotografias para a base de dados clínicos e familiares, sem coleta de material biológico (sangue).

() Concordo em participar no presente estudo na coleta de informações e fotografias para a base de dados clínicos e familiares e com coleta de material biológico (sangue).

() Concordo em participar no presente estudo na coleta de informações e fotografias para a base de dados clínicos e familiares e com coleta de material biológico (sangue) e armazenamento para uso em pesquisas futuras.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____

APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os Responsáveis pelo Paciente

O menor pelo qual você é responsável está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “Rede Brasileira de Osteogênese Imperfeita”. Este projeto pretende estruturar uma rede nacional organizada de referência para investigação, diagnóstico e tratamento da osteogênese imperfeita (OI) no Brasil. O projeto será realizado em colaboração com centros de referência para tratamento de OI de diferentes estados brasileiros.

Um dos objetivos deste projeto é implementar um registro de osteogênese imperfeita no Brasil. Atualmente, não há dados nacionais disponíveis sobre o número de casos atendidos nos centros de referência, tipo de terapia utilizada e resultados do tratamento. Esta base de dados pertencerá à Rede Brasileira de Osteogênese Imperfeita, que tem sua coordenação localizada no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Ao aceitar a participação, será preenchido um formulário com informações médicas do menor sob sua responsabilidade bem como de sua família. Dados clínicos como estatura, peso e deformidades ósseas serão anotados. Dados de exames realizados rotineiramente como raio x, densitometria óssea e exames cardiológicos serão coletados para este estudo. Fotografias poderão ser realizadas no decorrer do estudo.

O potencial desconforto da participação nesta etapa do estudo é apenas o tempo necessário para o preenchimento do formulário, que ocorrerá durante a consulta médica de rotina (cerca de 30 minutos).

Estas informações poderão não trazer benefícios diretos para o menor sob sua responsabilidade neste momento, mas o conhecimento acumulado sobre todos os indivíduos participantes, assim como, sobre o uso de medicamentos, o desenvolvimento físico e mental e os aspectos, clínicos, cirúrgicos e genéticos, ajudará os profissionais que atendem pacientes com osteogênese imperfeita a melhorar o tratamento dispensado.

Nesta base de dados, também está prevista a criação de um repositório de material genético (DNA), que será usado para investigação de causas genéticas da OI. Este material será armazenado no Serviço de Genética Médica do HCPA, em

condições apropriadas e ficará disponível para os pesquisadores dos hospitais participantes deste projeto.

Por isso, o menor sob sua responsabilidade está sendo convidado a realizar uma coleta de 5mL de sangue (cerca de uma colher de chá) para extração de DNA. A partir do sangue coletado serão realizadas análises laboratoriais que permitirão verificar características genéticas associadas à osteogênese imperfeita. O material coletado será armazenado de forma codificada. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos relacionados a OI. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa institucional e, se for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, e você será chamado para reconsentir com o uso do material.

Os potenciais riscos para esta etapa do estudo estão relacionados à coleta do material biológico. A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado, mas pode ocasionar dor e manchas roxa no local que desaparecem em poucos dias.

Esta base de dados não trará informações diretas para o atendimento do menor sob sua responsabilidade. Entretanto, quando os testes genéticos realizados detectarem informações que possam ser importantes para ele e/ou para a família, estas informações serão repassadas a você e vocês receberão aconselhamento.

Você poderá solicitar a retirada das informações e do material genético do menor pelo qual é responsável a qualquer momento, bastando solicitar por escrito ao responsável pelo projeto.

Os pesquisadores se comprometem a manter a confidencialidade de dados de identificação pessoal dos participantes, incluindo as fotografias, e os resultados serão divulgados de maneira agrupada sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

A participação no estudo é totalmente voluntária. A não participação ou desistência após ingressar no estudo não implicará em nenhum tipo de prejuízo ao atendimento que ele recebe ou venha a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação no estudo e os participantes não terão nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida antes e durante o curso do estudo com Dra. Têmis Maria Félix, pesquisadora responsável, pelo telefone (51) 33598011.

O Comitê de Ética em Pesquisa poderá ser contatado para esclarecimento de dúvidas, no 2º andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone (51) 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta.

Este termo foi elaborado em duas vias, sendo que uma delas entregue ao participante e a outra mantida com o grupo de pesquisadores.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, potenciais benefícios, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar:

() Concordo com a participação do menor sob minha responsabilidade no presente estudo apenas na coleta de informações e fotografias para a base de dados clínicos e familiares, sem coleta de material biológico (sangue).

() Concordo com a participação do menor sob minha responsabilidade no presente estudo na coleta de informações e fotografias para a base de dados clínicos e familiares e com coleta de material biológico (sangue).

() Concordo com a participação do menor sob minha responsabilidade no presente estudo na coleta de informações e fotografias para a base de dados clínicos e familiares e com coleta de material biológico (sangue) e armazenamento para uso em pesquisas futuras.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

(Se aplicável)

Nome do responsável: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____