



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DALILA AVILA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES DA OSTEOGÊNESE  
IMPERFEITA EM PACIENTES DO ESPÍRITO SANTO: ESTUDO DOS  
GENES *IFITM5*, *COL1A1* E *COL1A2***

VITÓRIA, ES

2018

**DALILA AVILA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES DA OSTEOGÊNESE  
IMPERFEITA EM PACIENTES DO ESPÍRITO SANTO: ESTUDO DOS  
GENES *IFITM5*, *COL1A1* E *COL1A2***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flavia de Paula

VITÓRIA, ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)  
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

---

S586c Silva, Dalila Avila, 1993 -  
Caracterização de mutações da Osteogênese Imperfeita em pacientes  
do Espírito Santo : estudo dos genes *IFITM5*, *COL1A1* e *COL1A2* / Dalila  
Avila Silva – 2018.  
78 f. : il.

Orientador: Flavia de Paula..

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do  
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Genes. 2. Osteogênese Imperfeita. 3. Biotecnologia. I. Paula, Flavia  
de. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.  
III. Título.

CDU: 61

---

**DALILA AVILA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES DA OSTEOGÊNESE  
IMPERFEITA EM PACIENTES DO ESPÍRITO SANTO: ESTUDO DOS  
GENES *IFITM5*, *COL1A1* E *COL1A2***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 27 de Fevereiro de 2018.

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flavia de Paula**

**Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora**

**Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes  
Guimarães (Examinador Interno)**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Prof. Dr. Carlos Magno Da Costa**

**Maranduba (Examinador Externo)**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

**Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira  
(Examinador Suplente)**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

VITÓRIA, ES

2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que sempre me deu forças e foi o meu pilar de sustentação e confiança quando tudo parecia dar errado.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Durante a minha vida inteira priorizaram os meus estudos e graças a eles hoje estou me formando mestre.

Ao meu irmão por todo carinho e ajuda quando necessitei.

Aos familiares que nunca estiveram ausentes e sempre me incentivaram a ir além.

À toda equipe do NGHM-UFES pelo companheirismo e amizade do dia-a-dia. Por toda disponibilidade em ajudar sempre que necessário. Em especial à Maíra Trancozo que ajudou em toda parte do sequenciamento e que esteve comigo ao longo destes dois anos estudando a Osteogênese Imperfeita. À Jucimara Figueiredo e Amanda Coutinho que compartilharam comigo momentos de frustrações e alegrias do mestrado. E à Jéssica Azevedo que esteve em colaboração comigo no experimento de validação das mutações.

Aos amigos que me apoiaram, me permitiram desabafar nos momentos difíceis e sempre depositaram confiança em mim.

À minha orientadora, professora Flávia de Paula, por ter me recebido no seu laboratório desde o segundo período da graduação, por todos estes anos acrescentando na minha formação, por toda paciência, disponibilidade e competência em me ajudar. Agradeço por ter ajudado a me tornar a profissional que sou hoje.

Às agências de apoio e financiamento: CAPES, FAPES, MCTI, CNPQ e MEC pelo apoio financeiro.

*“Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros  
de gigantes”. (Isaac Newton)*

## RESUMO

SILVA, D A. **Caracterização de mutações da Osteogênese Imperfeita em pacientes do Espírito Santo: estudo dos genes *IFITM5*, *COL1A1* e *COL1A2***. 2018. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença que ocorre devido à desordem generalizada do tecido conjuntivo causando principalmente fragilidade óssea. Essa desordem, na maioria das vezes, é causada por mutações nos genes produtores das cadeias do colágeno tipo I, *COL1A1* ou *COL1A2*, embora mutações em novos genes envolvidos na via do metabolismo ósseo têm sido constantemente descobertas. Atualmente, existem 17 genes relacionados com esta doença. Um deles é o gene *IFITM5*, ainda pouco caracterizado na maioria das populações. Por possuir vários genes causadores de OI, o *Next Generation Sequencing* (NGS), uma técnica de sequenciamento em larga escala, tem sido amplamente utilizada. Contudo, as mutações identificadas por NGS precisam ser validadas para dar confiabilidade aos resultados. Assim, este trabalho visou identificar mutações no gene *IFITM5* e validar mutações identificadas por NGS nos genes *COL1A1* e *COL1A2* para caracterizar o padrão de mutações nestes genes em pacientes do Espírito Santo. Este estudo contou com uma amostra inicial de 31 pacientes que foram previamente analisados para outros genes. Desta amostra, 8 indivíduos que apresentaram resultados moleculares inconclusivos foram estudados para o gene *IFITM5*. Foi detectada a presença da mutação c.-14C>T em um paciente. Esta mutação ocorre na região 5'-UTR do gene e é recorrente em várias populações do mundo. A validação de mutações foi realizada em 16 indivíduos que apresentaram alterações genéticas nos genes *COL1A1* ou *COL1A2* detectadas por NGS. Apenas uma das sequências identificadas por NGS não foi validada. Este estudo confirmou que mutações no gene *COL1A1* e *COL1A2* são encontradas, em aproximadamente 75% dos pacientes, enquanto que no gene *IFITM5* são encontradas mutações em, aproximadamente, 3% dos pacientes com OI do Espírito Santo. Esses resultados poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias de diagnóstico molecular mais eficientes para esta doença.

Palavras-chave: *Sequenciamento de Sanger, Metabolismo Ósseo, IFITM5, COL1A1 e COL1A2.*

## ABSTRACT

SILVA, D A. **Profile of mutations in Osteogenesis Imperfecta in patients from Espírito Santo: study of *IFITM5*, *COL1A1* and *COL1A2* genes.** 2018. 78f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Osteogenesis imperfecta (OI) is a disease that occurs due to the generalized disorder of the connective tissue causing mainly bone fragility. This disorder is most often caused by mutations in the genes producing collagen type I chains, *COL1A1* or *COL1A2*, although mutations in new genes involved in the pathway of bone metabolism have been constantly discovered. There are currently 17 genes related to this disease. One of them is the *IFITM5* gene, still little featured in most populations. Because it has several OI-causing genes, the Next Generation Sequencing (NGS) methodology, a large-scale sequencing strategy, has been widely used. However, the mutations identified by NGS need to be validated to give reliability to the results. Thus, the objective of this work was to identify mutations in the *IFITM5* gene and validate mutations identified by NGS in the genes *COL1A1* and *COL1A2* to characterize the pattern of mutations in these genes in patients from Espírito Santo. This study had an initial sample of 31 patients who were previously analyzed for other genes. From this sample, 8 individuals who presented inconclusive molecular results were studied for the *IFITM5* gene. The presence of the c. -14C> T mutation was detected in one patient. This mutation occurs in the 5'-UTR region of the gene and is recurrent in several populations of the world. The validation of mutations was performed in 16 individuals who presented genetic alterations in the *COL1A1* or *COL1A2* genes detected by NGS. Only one of the sequences identified by NGS has not been validated. This study confirmed that mutations in the *COL1A1* and *COL1A2* genes are found in approximately 75% of patients, whereas in the *IFITM5* gene mutations are found in approximately 3% of patients with OI of Espírito Santo. These results may help in the development of more efficient molecular diagnostic strategies for this disease.

*Key words: Sanger Sequencing, Bone Metabolism, IFITM5, COL1A1 e COL1A2.*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crânio compatível com a deformidade em <i>tam-o-shanter</i> encontrado pelo professor John Garstang.....	20
Figura 2. Má formação de dentes e ossos.....	20
Figura 3. Molécula do pró-colágeno tipo I.....	26
Figura 4. Biossíntese do colágeno tipo I.....	27
Figura 5. Características radiológicas da OI tipo V.....	33
Figura 6. Mutação no <i>IFITM5</i> da OI tipo V.....	34

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Visão geral dos tipos de OI baseado nos genes afetados.....	23
Quadro 2. Classificação da OI baseada nos fenótipos apresentados.....	24
Quadro 3. Relação de <i>Primers</i> Utilizados no Estudo do Gene <i>IFITM5</i> .....	44
Quadro 4. Relação de <i>Primers</i> Utilizados no Estudo dos Genes <i>COL1A1</i> e <i>COL1A2</i> .....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostra inicial do estudo.....	41
Tabela 2. Mutações encontradas nos genes <i>COL1A1</i> e <i>COL1A2</i> em estudos prévios por NGS.....	42
Tabela 3: Dados clínicos dos pacientes estudados para o gene <i>IFITM5</i> .....	43
Tabela 4. Concentrações de reagentes para PCR do gene <i>IFITM5</i> .....	44
Tabela 5. Padronização da técnica de PCR para o gene <i>IFITM5</i> .....	44
Tabela 6. Condições das etapas de amplificação dos fragmentos dos genes <i>COL1A1</i> e <i>COL1A2</i> , concentração de $MgCl_2$ e de DMSO utilizadas na PCR.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{l}$  – Microlitros

AC – Antes de Cristo

APS – Persulfato de Amônio

*BMP1* – Gene da Proteína Morfogenética Óssea (do inglês *Bone Morphogenetic Protein 1*)

BRIL – Proteína restrita ao tecido ósseo (do inglês *Bone-Restricted IFITM-Like Protein 5*)

$\text{Ca}^{2+}$  - Íon de Cálcio

*COL1A1* – Gene do colágeno tipo I, alfa I

*COL1A2* – Gene do colágeno tipo I, alfa II

COOH – Grupo carboxila

*CREB3L1* – Gene da proteína OASIS (do inglês *cAMP Response Element-Binding Protein 3-Like 1*)

CRISPR - Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

*CRTAP* – Gene da proteína CRTAP (do inglês *Cartilage-Associated Protein*)

CyPB – Ciclofilina B

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotideo trifosfato

ECM – Matriz Extracelular

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

ER – Retículo Endoplasmático

*FKBP10* – Gene da proteína FKBP65 (do inglês *FK506-Binding Protein 10*)

Gly – Glicina

HINSG – Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória

HSP47 – Proteína de choque térmico 47 (do inglês *Heat-Shock Protein 47*)

*IFITM5* – Gene que codifica a proteína BRIL (do inglês *Interferon Induced Transmembrane Protein 5*)

INCDS - Grupo de Nomenclatura Internacional para Desordens Constitucionais do Esqueleto (do inglês *International Nomenclature Group for Constitutional Disorders ICHG of the Skeleton*)

*LEPRE1* – Gene da proteína *P3H1* (do inglês *Leucine- And Proline-Enriched Proteoglycan 1*)

LH2 – Lisil-hidroxilase 2

MALEP – Sequência dos aminoácidos metionina, alanina, leucina, glutamina e prolina adicionada à proteína Bril após mutação c.-14C>T no gene *IFITM5*

*MBTPS2* – Gene da proteína S2P (do inglês *Membrane-Bound Transcription Factor Protease, Site 2*)

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

min – Minutos

mM – Milimolar

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês *National Center for Biotechnology Information*)

ng – Nanograma

NGS – Sequenciamento de próxima geração (do inglês *Next Generation Sequencing*)

NH<sub>2</sub> - Grupo amino

°C – Graus Celsius

OI - Osteogênese Imperfeita

OMIM – Base de dados *online* de doenças com herança mendeliana (do inglês *Mendelian Inheritance in Man*)

OSX – Proteína OSTERIX

P3H1 – Proteína prolil-3-hidroxilase 1

Pb – Pares de Base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PEDF – Fator derivado do epitélio pigmentado (do inglês *Pigment Epithelium-Derived Factor*)

*PLOD2* – Gene da proteína LH2 (do inglês *Procollagen-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2*)

Pol. – Polimerase

*PPIB* – Gene da proteína CYPB (do inglês *Peptidyl-Prolyl Isomerase B*)

Pro – Prolina

s – Segundos

S2P - Protease do sítio-2

*SERPINF1* – Gene da proteína PEDF (do inglês *Serpin Peptidase Inhibitor, Clade F, Member 1*)

*SERPINH1*– Gene da proteína Hsp47 (do inglês *Serpin Peptidase Inhibitor, Clade H, Member 1*)

*SP7* – Gene da proteína OSTERIX (do inglês *Specificity Protein 7*)

*SPARC* – Gene da Osteonectina (do inglês *Secreted Protein, Acidic, Cysteine-Rich*)

TBE – Tampão tris/borato/EDTA

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

*TMEM38B* – Gene da proteína TRIC-B (do inglês *Transmembrane Protein 38B*)

TRIC-B – Canal de cátion intracelular trimérico tipo B (do inglês *Trimeric Intracellular Cation Channel Type B*)

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UTR – Regiões não traduzidas (do inglês *Untranslated Region*)

*WNT1* – Gene da proteína WNT1 (do inglês *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 1*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>2.1 Caracterização da OI</b> .....	16
<b>2.2 Histórico da OI</b> .....	19
<b>2.3 Classificação</b> .....	21
<b>2.4 O Colágeno</b> .....	24
2.4.1 Síntese do colágeno tipo I.....	26
2.4.2 Mutações na molécula de colágeno tipo I.....	28
<b>2.5 Genes associados à OI com padrão de herança dominante</b> .....	29
2.5.1 <i>COL1A1</i> .....	29
2.5.2 <i>COL1A2</i> .....	29
2.5.3 <i>IFITM5</i> .....	30
2.5.3.1 <i>OI tipo V</i> .....	32
<b>2.6 Genes associados à OI com padrão de herança recessivo</b> .....	36
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	40
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	40
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
<b>4.1 Amostra</b> .....	41
<b>4.2 Coleta e Extração de DNA</b> .....	43
<b>4.3 Reação em Cadeia Da Polimerase (PCR)</b> .....	43
4.3.1 PCR do gene <i>IFITM5</i> .....	43
4.3.2 PCR dos genes <i>COL1A1</i> e <i>COL1A2</i> .....	45
<b>4.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</b> .....	46
<b>4.5 Sequenciamento de Sanger</b> .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>6 CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS</b> .....	66
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68

## 1 – INTRODUÇÃO

A Osteogênese Imperfeita (OI), também conhecida como “doença dos ossos de vidro”, é um distúrbio generalizado do tecido conjuntivo caracterizado por ossos frágeis e fácil susceptibilidade a fraturas (MARINI et al., 2007). É uma desordem hereditária que acomete principalmente o tecido ósseo, ainda que outros sistemas orgânicos possam estar envolvidos (TREJO & RAUCH, 2016).

A manifestação clínica da OI, representada principalmente pela fragilidade do tecido ósseo, é decorrente de um profundo impacto das mutações nos genes associados ao colágeno tipo I sobre as estruturas ósseas, uma vez que o colágeno tipo I é a principal proteína constituinte dos ossos (HUBER, 2007).

A severidade da doença varia muito, desde fraturas intra-uterinas e morte perinatal à formas muito leves, sem fraturas. Manifestações extra-esqueléticas típicas também estão associadas com a doença (MICHELL et al., 2007).

A divisão clássica da OI foi proposta por Sillence et al., (1979) levando em consideração os aspectos clínicos e radiológicos da doença. Esta divisão inclui somente mutações nos genes codificadores do colágeno tipo I, *COL1A1* e *COL1A2*. Por apresentar grande heterogeneidade clínica, estes autores categorizaram a doença em quatro tipos que ainda são utilizados pela “Nosologia e Classificação de Desordens Genéticas Esqueléticas de 2015” (BONAFE et al., 2015).

A incidência de OI nas populações mundiais é de aproximadamente 1: 20.000 nascidos (MARINI, 1988).

Durante muito tempo, o tratamento desta doença limitou-se às eventuais correções cirúrgicas das deformidades, todavia, o procedimento cirúrgico nesses pacientes era complicado devido à fragilidade intrínseca dos ossos. Ultimamente, o uso de fármacos, como os bifosfonatos pamidronato e alendronato, mudou a qualidade de vida dos pacientes de OI, pois reduzem a reabsorção óssea, fortalecendo a estrutura óssea e reduzindo o número de fraturas dos pacientes (NUSSBAUM et al., 2008). No Brasil, o tratamento da OI é disponibilizado pelo SUS desde 2001, com a instituição da Portaria GM 2305/2001 (BRASIL, 2001).



O Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), localizado no município de Vitória, ES, é um dos centros de referência do país para tratamento da OI. Atende demanda de pacientes não só de todo o estado do Espírito Santo, quanto de estados vizinhos.

O aconselhamento genético é muito importante para famílias que apresentam casos da doença. Ele irá informar sobre o risco de crianças da família nascerem portadoras de mutações nos genes da OI. Para isto é importante o diagnóstico molecular dos pais e familiares. Dependendo do gene mutado, o padrão de herança da doença será diferente. Portanto, o desenvolvimento de técnicas eficazes de diagnóstico molecular poderá auxiliar no aconselhamento genético mais fidedigno, orientando famílias em risco e ajudando na prevenção de novos casos da doença na população.

O *Next Generation Sequencing* (NGS), ou Sequenciamento de Nova Geração, é uma tecnologia avançada de Sequenciamento de DNA em larga escala, que tem contribuído rapidamente nas descobertas de fatores de risco para doenças genéticas (CAMPOPIANO et al., 2017). É uma metodologia que possibilita processar grande volume de dados em menor espaço de tempo e menor custo relativo que o Sequenciamento direto por Sanger, porém, por ser menos preciso, ainda é interessante validar os dados gerados por ele, através de outras metodologias.

Além disto, com o avanço da biologia molecular e o surgimento de técnicas inovadoras, que editam o DNA humano, como o CRISPR, tem se especulado muito sobre desenvolvimento de futuras terapias gênicas para doenças genéticas (RAMOS, 2016). Para o uso destas técnicas, é necessário, primeiramente, conhecer a mutação que está causando a doença no indivíduo. Caracterizar o padrão de mutações em genes que causam OI pode ajudar a melhorar estratégias de diagnóstico molecular para a doença. Assim, neste trabalho objetivou-se caracterizar o perfil de mutações nos genes *COL1A1*, *COL1A2* e *IFITM5* nos pacientes com OI do Espírito Santo.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DA OI

A fragilidade óssea na OI é, pelo menos, em parte, causada por uma baixa densidade óssea e alterações na matriz óssea. De fato, o osso na OI é mais quebradiço devido ao maior conteúdo mineral, propriedades de colágeno alteradas e nanoestrutura óssea prejudicada. A hipermineralização parece ser uma característica clássica de OI. As mudanças estruturais nas cadeias de pró-colágeno provavelmente não são a causa direta dessa hipermineralização, pois, ela também é observada na OI causada por mutações que afetam genes cujos produtos interagem de forma pós traducional com o colágeno tipo I e alteram sua modificação (BLOUIN, 2017).

Os sintomas e sinais clínicos podem ser classificados em esqueléticos e extraesqueléticos. As características esqueléticas incluem fraturas excessivas / atípicas, baixa estatura, escoliose e deformidades basilares do crânio. As manifestações extraesqueléticas incluem perda auditiva, observada em 50% dos adultos e em 5% das crianças com OI; a dentina anormal, que leva ao aparecimento de pequenos dentes deformados, denominado dentinogênese imperfeita, juntamente com a má oclusão são as principais anormalidades dentárias; a esclerótica pode ser de cor azul ou cinza. As anormalidades do tecido conjuntivo que levam à hiperextensibilidade das articulações podem resultar em deslocação das articulações e da cabeça do rádio. A hipercalciúria observada em 36% dos pacientes pode resultar em cálculos renais. O envolvimento cardiovascular leva à dilatação da raiz aórtica e ao prolapso da valva mitral (SAM & DHARMALINGAM, 2017).

As manifestações neurológicas incluem macrocefalia, hidrocefalia, invaginação basilar (o paciente apresenta dor de cabeça, paralisias do nervo craniano inferior, disfagia, quadriparesia, ataxia e nistagmo) e cifose cervical (pode causar compressão do cordão cervical, distúrbios sensoriais ou motores das extremidades das partes superiores ou inferiores que progridem para quadriparesia) (SAM & DHARMALINGAM, 2017).

Os defeitos genéticos na OI traduzem-se em defeitos na síntese, estrutura, processamento, modificação pós-traducional e dobramento de colágeno, além de ligações cruzadas entre moléculas de colágeno. Existem também defeitos na mineralização óssea e defeito osteoblástico com insuficiência de colágeno (SAM & DHARMALINGAM, 2017).

Anteriormente, a OI era conhecida como um distúrbio autossômico dominante causado por mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, codificadores das cadeias  $\alpha 1$  (I) e  $\alpha 2$  (I) do colágeno tipo I, a proteína mais abundante de matrizes extracelulares de osso, pele e tendão. Embora cerca de 85-90% dos casos sejam causados por mutações estruturais ou quantitativas nos próprios genes do colágeno, o transtorno é agora mais compreendido como um transtorno relacionado ao colágeno e não restritamente causado por defeitos na sua síntese (FORLINO et al., 2011; MARINI et al., 2013).

O diagnóstico de Osteogênese Imperfeita é feito em indivíduos com histórico familiar positivo para a doença, ou nos quais estão presentes muitas características típicas. Fraturas de trauma leve, deformidades de curvatura de ossos longos e deficiência de crescimento são características de marca registrada (FORLINO & MARINI, 2016). Dependendo da idade e da gravidade, as características esqueléticas podem incluir macrocefalia, face triangular, dentinogênese imperfeita, deformidades da parede torácica, escoliose ou cifose (FORLINO et al., 2011).

O diagnóstico normalmente é realizado por profissionais da área, baseado em características clínicas e radiológicas do paciente. Porém este pode ser difícil na ausência de membros da família afetados e quando a fragilidade óssea não está associada a anormalidades extraesqueléticas óbvias (RAUCH & GLORIEUX, 2004).

Quando possível, o diagnóstico de OI pode ser feito ainda com a criança no útero da mãe (pré-natal) ou após o nascimento, caso haja suspeita de OI (neo-natal). O diagnóstico pré-natal é feito através de ultrassonografias, estudos radiográficos do abdômen materno, ressonância magnética, além de procedimentos invasivos que detectem anormalidades sugestivas de OI (reduzida mineralização do crânio, curvatura, encurtamento e/ou fraturas dos ossos longos). A presença dessas características clínicas é uma importante razão para um encaminhamento para diagnóstico molecular (SOUZA et al., 2006).

O diagnóstico pós-natal é feito através de radiografias na criança suspeita de possuir OI. Fraturas recorrentes e/ou inexplicáveis, baixa concentração de massa óssea, de preferência com exclusão de causas secundárias, um histórico familiar de OI e pedido de confirmação de diagnóstico clínico, são, também, razões para um encaminhamento para diagnóstico molecular (VAN DIJK et al, 2011a).

Dependendo da idade de apresentação dos sintomas, pode ser difícil distinguir a OI de outras doenças genéticas, como por exemplo, Síndrome de Ehlers-Danlos tipo Arthrochalasia, dentinogênese imperfeita isolada, esclerótica azulada e fragilidade da córnea, hipofosfatase, causas não genéticas de fraturas e osteoporose juvenil idiopática. Apenas métodos de biologia molecular e o estudo genético podem confirmar o diagnóstico de OI (TENG et al., 2003; VAN DIJK et al., 2012).

Frequentemente, o diagnóstico clínico é incerto, principalmente em pacientes com histórico de fratura compatível com diagnóstico de OI leve, mas que não possuem esclerótica azulada / acinzentada nem dentinogênese imperfeita. Tal fenótipo pode ser causado por mutações em genes relacionados ao metabolismo ósseo, levando a um diagnóstico de OI, porém o quadro clínico também seria compatível com um diagnóstico de osteoporose juvenil, uma categoria um pouco mal definida que pode incluir perturbações genéticas e não genéticas da fragilidade óssea. Portanto, encontrar uma causa genética da fragilidade óssea em casos tão pouco claros é importante para estabelecer um diagnóstico, para a identificação de outros membros da família que estão em risco de fraturas e para aconselhamento genético (BARDAL et al., 2017).

A OI não possui cura, porém há tratamentos que ajudam na qualidade de vida dos pacientes. Os objetivos desses tratamentos são: reduzir as taxas de fraturas, prevenir deformidades ósseas longas, minimizar a dor crônica e maximizar a capacidade funcional, através da reabsorção óssea e do aumento da densidade óssea. As principais modalidades de tratamento podem ser agrupadas em medicamentos, intervenção cirúrgica, fisioterapia e terapias experimentais (SAM & DHARMALINGAM, 2017). Os principais medicamentos utilizados são os Bifosfonatos: pamidronato a alendronato. Pesquisas clínicas demonstram uma melhor densidade óssea relacionada à terapia com administração de bifosfonatos (Pamidronato) com infusões intravenosas cíclicas. Quando esses medicamentos

foram introduzidos como um tratamento farmacológico para aumentar a densidade óssea, crianças diagnosticadas com OI apresentaram melhora na densidade óssea e mudanças na qualidade de vida (WIGGINS & KREIKEMEIER, 2017).

## 2.2 HISTÓRICO DA OI

A primeira descrição científica da OI foi dada pelo cirurgião do exército sueco Olaus Jakob Ekman (1788) que, em sua tese sobre "osteomalácia congênita", descreveu uma família de três gerações com fragilidade óssea hereditária. Desde então, muitos nomes foram usados para descrever a fragilidade óssea familiar (VAN DIJK et al., 2011a).

O termo "Osteogenesis Imperfecta" apareceu pela primeira vez na literatura, em 1849, quando Willem Vrolik descreveu em seu livro "Patologias Anatômicas" o caso de um recém-nascido com múltiplas fraturas e ossos wormianos, que faleceu três dias após seu nascimento. Vrolik foi um dos primeiros a perceber que muitas displasias esqueléticas descritas anteriormente não eram resultado de uma degeneração secundária adquirida pós-natal, como "raquitismo" ou "osteomalácia", como acreditavam muitos de seus contemporâneos, mas sim resultado de um comprometimento na ossificação primária, ainda no período pré-natal. Inicialmente a OI e a Osteopsatirose Idiopática foram consideradas como patologias distintas, ambas relacionadas com o raquitismo, e passaram-se quase 100 anos para se demonstrar que OI e osteopsatirose idiopática constituem uma única entidade (KIM & GONZALEZ, 1993; BALJET 2002).

Porém o registro mais antigo de um caso de OI foi descrito por Gray (1969) em uma múmia egípcia datada de cerca de 1000 anos AC, encontrada ao lado leste do Rio Nilo entre os anos 1902-1904 pelo professor John Garstang. As radiografias destes achados revelaram misteriosos ossos de aparência estranha que permitiram que o conteúdo do caixão fosse retirado e examinado. O resultado do estudo comprovou que os restos ósseos eram de uma criança com Osteogênese Imperfeita. O crânio era um mosaico de inúmeros ossos Wormianos, compatível com a deformidade em *tam-o-shanter*, relacionada a OI (Figura 1). Verificaram ainda a existência de

dentição deformada compatível com dentinogênese imperfeita e deformidade e curvatura dos ossos longos (Figura 2) (GRAY, 1969; MELO, 2015).



Figura 1. Crânio compatível com a deformidade em tam-o-shanter encontrado pelo professor John Garstang. Fonte: GRAY, 1969.

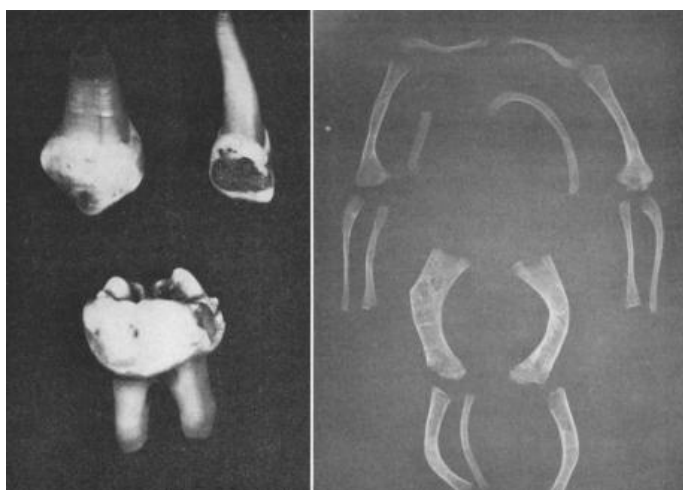


Figura 2. Má formação de dentes e ossos. Registros da primeira criança com OI, encontrados do professor John Garstang. Fonte: GRAY, 1969.

No século 20, ficou claro que a OI era uma doença que mostrava uma variabilidade clínica notável com severidade variando desde a morte no período perinatal até o aumento sutil na frequência de fratura (VAN DIJK et al., 2011a).

Looser (1906) fez a primeira classificação de OI em “congenita” e “tardia”. Após isto foram feitas tentativas para classificar ainda mais a OI, e em 1979 foi proposta a “classificação de Silience” (Silience et al., 1979), que, embora de forma ajustada, ainda é utilizada até hoje, principalmente nos casos em que não há diagnóstico molecular.

### 2.3 – CLASSIFICAÇÃO

A classificação de Sillence et al. (1979) inclui quatro tipos de OI, representados por algarismos romanos: I, II, III e IV, causados por mutações associadas ao padrão de herança autossômico dominante nos genes codificadores do colágeno tipo I, *COL1A1* e *COL1A2*. Esta classificação foi proposta baseada em critérios clínicos e radiológicos de acordo com o grau de severidade da doença.

O tipo I é considerado a forma leve da OI. Caracterizado por estatura normal, esclera azulada e dentinogênese imperfeita. As primeiras fraturas podem ocorrer no nascimento, ao vestir as primeiras fraldas, ou ainda quando a criança começa a andar e ao cair. As fraturas ocorrem, geralmente, algumas vezes por ano, diminuem na puberdade e voltam a aumentar a frequência em mulheres pós-menopausa e em homens acima de cinquenta anos (STEINER et al., 2005).

O tipo II é considerado a forma perinatal letal da doença. Ainda no útero, há o aparecimento de graves e longas deformidades ósseas, incluindo fraturas nas costelas que podem levar a um comprometimento respiratório e eventualmente a morte. O peso e o comprimento do feto são reduzidos em relação à semana gestacional. Nestes casos podem ocorrer abortos espontâneos com os fetos mortos ainda no útero ou no período neonatal. Os indivíduos que se encaixam nesta classificação possuem esclera azulada e o tecido conjuntivo extremamente frágil. Devido à má mineralização óssea, o crânio é grande e frágil. Mais de 60% das crianças afetadas morrem no primeiro dia; 80% morrem ainda na primeira semana e a sobrevivência para além de um ano é extremamente rara e geralmente envolve intenso e contínuo suporte (BYERS et al., 1988).

O tipo III é a forma grave da doença, porém a qual o indivíduo acometido consegue sobreviver ao período neonatal. É caracterizado por severa e progressiva deformidade esquelética que pode ter início logo no nascimento. Podem ocorrer múltiplas fraturas no nascimento e o indivíduo pode sofrer frequentes fraturas após o período neonatal, durante sua vida, devido à natureza altamente frágil dos seus ossos. A incidência de fratura continua elevada mesmo na vida adulta. Os indivíduos têm evidente baixa estatura e, por causa de sua deformidade e fragilidade óssea,

fazem uso, frequentemente de cadeira de rodas. A dentinogênese imperfeita é comumente presente nestes pacientes (ROUGHLEY et al., 2003).

A OI do tipo IV apresenta variabilidade fenotípica. Os pacientes podem apresentar desde sintomas graves, a mais suaves nos quais pode ser difícil realizar o diagnóstico. As principais características dos pacientes com OI do tipo IV são dentinogênese imperfeita, que é comum, mas pode ser leve, perda de audição na fase adulta e esclera normal a acinzentada. A estatura é variável e pode ocorrer impressão basilar (BASEL & STEINER, 2009).

Mutações que levam a uma redução quantitativa da produção de colágeno tipo I, estruturalmente normal, resultam num fenótipo mais leve de OI (OI tipo I). Mutações que causam alterações estruturais em uma das cadeias do pró-colágeno tipo I podem afetar a associação da cadeia, a formação da tripla hélice, a secreção e/ou formação fibrilar, e geralmente resultam em fenótipos mais graves, incluindo o fenótipo perinatal letal (OI tipo II) (BALDRIDGE et al., 2008).

Nos últimos anos, genes não colágenos, cujos produtos de proteína interagem com o colágeno, têm sido identificados. Dentre eles estão *SERPINF1*, *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10*, *TMEM38B*, *SP7*, *BMP1* e *IFITM5*. A maioria das mutações nestes genes possui herança autossômica recessiva e são mutações nulas. A exceção é um único defeito dominante em *IFITM5*, que codifica a proteína BRIL e leva a calos hipertróficos e ossificação de membrana interóssea (MARINI et al., 2014).

Com estas descobertas, novas formas de OI têm surgido. Atualmente a classificação molecular genética da OI contém tipos que incluem tanto o padrão de herança autossômico dominante como o autossômico recessivo e exibe ampla variação de severidade clínica (MARINI & BLISSETT, 2013).

A atual classificação dos tipos de OI varia na literatura. Alguns autores a classificam de acordo com o gene afetado (Quadro 1) (KANG et al., 2017). Outros, classificam de acordo com o fenótipo apresentado (Quadro 2) (SAM & DHARMALINGAM, 2017). O Grupo de Nomenclatura Internacional para Desordens Constitucionais do Esqueleto (*International Nomenclature Group for Constitutional Disorders ICHG of the Skeleton* (INCDS)) propôs no Congresso Internacional de Genética Humana em



2009, que a OI fosse classificada em cinco grupos diferentes, baseados apenas no fenótipo (SAM & DHARMALINGAM, 2017). Kang et al. (2017) classificam a OI em dezoito tipos, de acordo com o gene afetado. Esta classificação tem sido a mais utilizada na literatura atual.

De acordo com estas recentes descobertas, defeitos nos genes *IFITM5* e *SERPINF1* resultam nos tipos V e VI de OI via insuficiência na mineralização óssea, enquanto que defeitos nos genes *CRTAP*, *LEPRE1* e *PPIB* causam os tipos VII a IX de OI via modificação pós-traducional defeituosa no colágeno. Defeitos nos genes *SERPINH1* e *FKBP10* causam os tipos X e XI de OI devida a comprometimento da função das chaperonas, defeitos nas dobras e outros processos envolvendo o colágeno, enquanto defeitos no *SP7/OSX*, *WNT1*, *TMEM38B* e *CREB3L1*, perturbam o desenvolvimento do osteoblasto. Por último, a ausência da C-propeptidase *BMP1* do colágeno tipo I causa o tipo XII de OI devido à alteração na maturação/processamento do colágeno (MARINI et al., 2014).

Quadro 1. Visão geral dos tipos de OI baseado nos genes afetados. Fonte: Adaptado de KANG et al, 2017.

Tipo de OI	Padrão de Herança	Gene Defeituoso	Proteína Defeituosa
<b>Defeitos na síntese e estrutura do colágeno:</b>			
Tipo I, II, III e IV	AD	<i>COL1A1</i> ou <i>COL1A2</i>	$\alpha 1(I)$ ou $\alpha 2(I)$ do colágeno
<b>Defeitos na mineralização óssea:</b>			
Tipo V	AD	<i>IFITM5</i>	BRIL
Tipo VI	AR	<i>SERPINF1</i>	PEDF
<b>Defeitos na modificação do colágeno:</b>			
Tipo VII	AR	<i>CRTAP</i>	<i>CRTAP</i>
Tipo VIII	AR	<i>LEPRE1</i>	P3H1
Tipo IX	AR	<i>PPIB</i>	<i>PPIB</i> (C $\gamma$ PB)
<b>Defeitos no processamento do colágeno:</b>			
Tipo X	AR	<i>SERPINH1</i>	HSP47
Tipo XI	AR	<i>FKBP10</i>	FKBP65
Não-classificado	AR	<i>PLOD2</i>	LH2
Tipo XII	AR	<i>BMP1</i>	<i>BMP1</i>
<b>Defeitos na diferenciação e função osteoblástica:</b>			
Tipo XIII	AR	<i>SP7</i>	<i>SP7</i> (OSTERIX)
Tipo XIV	AR	<i>TMEM38B</i>	TRIC-B
Tipo XV	AR	<i>WNT1</i>	<i>WNT1</i>
Tipo XVI	AR	<i>CREB3L1</i>	OASIS
Tipo XVII	AR	<i>SPARC</i>	<i>SPARC</i> (Osteonectina)
Tipo XVIII	XR	<i>MBTPS2</i>	S2P

AD: autossômico dominante; AR: autossômico recessivo; XR; recessivo ligado ao X.

Quadro 2. Classificação da OI baseada nos fenótipos apresentados. Fonte: Adaptado de SAM & DHARMALINGAM, 2017.

<b>Nova classificação da OI</b>	<b>Tipos de OI incluídos</b>	<b>Fenótipo</b>
1	I	Leve, não deformável
2	II	Severo, visto como forma perinatal e letal
3	III, VI, VIII, IX, X, Síndrome de Bruck tipo 1	Moderadamente severo. Progressivamente deformador
4	IV, IV, VII, XI, XII, XIII	Moderado
5	V, síndrome da osteoporose-pseudoglioma, osteoporose juvenil idiopática, síndrome de Bruck tipo 1 e tipo 2	Moderado, calcificação das membranas interósseas

Os pacientes envolvidos neste estudo foram classificados de acordo com a classificação original de Sillence et al. (1979) (tipos I ao IV), portanto utilizaremos a mesma durante todo o desenvolvimento desta dissertação.

## 2.4 – O COLÁGENO

O colágeno é a proteína mais abundante dos mamíferos. A família de colágeno compreende 28 membros. Os colágenos são depositados na matriz extracelular e a maioria deles forma montagens supramoleculares. Desempenham papéis estruturais e contribuem para propriedades mecânicas, organização e forma dos tecidos. Eles interagem com células através de várias famílias de receptores e regulam a sua proliferação, migração e diferenciação. Alguns colágenos têm uma distribuição de tecido restrita e, portanto, funções biológicas específicas. A característica estrutural comum dos colágenos é a presença de uma tripla hélice que pode variar da maior parte de sua estrutura (96% para o colágeno tipo I) para menos de 10% (colágeno tipo XII). (RICARD-BLUM, 2011).

Todas as moléculas de colágeno consistem em três cadeias polipeptídicas, chamadas “cadeias  $\alpha$ ”, e contêm pelo menos um domínio composto de sequências

repetidas de Gly-X-Y em cada uma das cadeias constituintes. A presença de glicina, o menor aminoácido, a cada três posições, é essencial para o empacotamento de uma estrutura parecida com a de “bobina enrolada”. As posições X e Y podem ter qualquer aminoácido diferente da glicina, mas a prolina é frequentemente encontrada na posição X e a 4-hidroxi prolina na posição Y. As 4-hidroxi prolinas desempenham um papel particularmente importante porque estes resíduos são essenciais para a estabilidade da tripla hélice (MYLLYHARJU & KIVIRIKKO, 2004).

Os colágenos formadores de fibrilas, como o colágeno tipo I, são primeiro sintetizados como pró-colágenos, precursores, compostos por cadeias de pro- $\alpha$  que contêm extensões globulares NH<sub>2</sub>-terminal e COOH-terminal, chamadas propeptídeos N- e C- (KUIVANIEMI et al., 1991).

O colágeno tipo I é a principal proteína estrutural do osso, pele, tendão, ligamentos, esclerótica, córnea e de outros tecidos fibrosos. A molécula do pró-colágeno tipo I é formada a partir de duas cadeias pro $\alpha$ 1(I) (codificadas no cromossomo 17 pelo gene *COL1A1*) e uma cadeia semelhante, mas distinta pro $\alpha$ 2(I) (codificada no cromossomo 7 pelo gene *COL1A2*) (Figura 3). O domínio da tripla hélice é composto por 338 repetições de Gly-X-Y organizadas em *tandem*; a prolina frequentemente está na posição X, e a hidroxiprolina ou hidroxilisina na posição Y. A glicina, o menor aminoácido, é a única unidade compacta o suficiente para ocupar a posição axial da hélice, e, conseqüentemente, as mutações que substituem estas glicinas por outros aminoácidos são altamente desorganizadoras da estrutura helicoidal (NUSSBAUM et al., 2008).

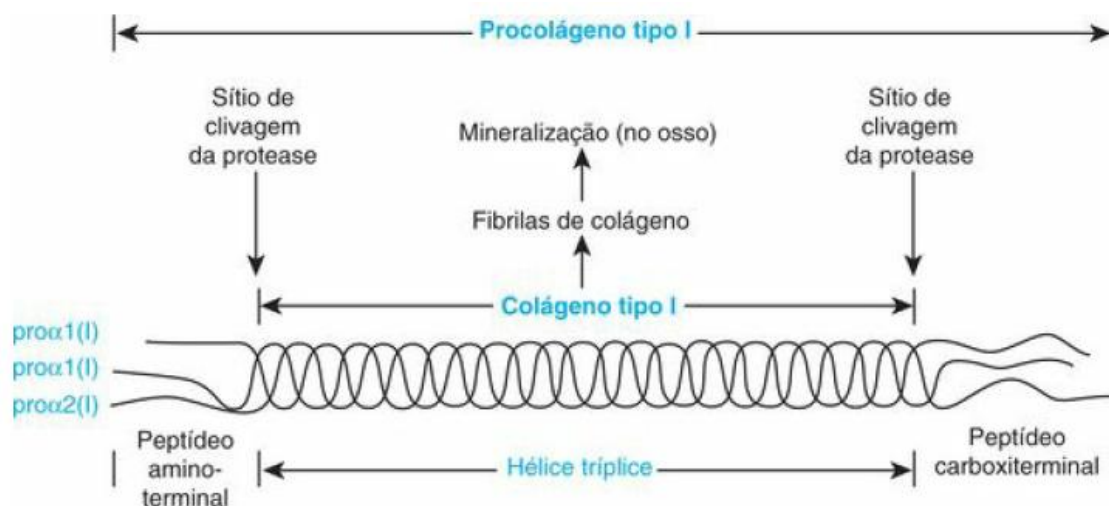


Figura 3. Molécula do pró-colágeno tipo I. Fonte: NUSSBAUM et al., 2008.

A OI é principalmente causada por defeitos quantitativos ou qualitativos de colágeno tipo I (MAASALU et al., 2015). Aproximadamente 90% dos indivíduos afetados com OI são heterozigotos para uma variante causal com herança autossômica dominante em um dos dois genes, *COL1A1* ou *COL1A2*, que codificam as cadeias pro-α1 (I) e pro-α2 (I), respectivamente, de procolágeno de tipo I (VAN DIJK et al., 2011a).

#### 2.4.1 – Síntese do colágeno tipo I

No retículo endoplasmático rugoso, as duas cadeias pro-α1 (I) e a cadeia pro-α2 (I) se alinham. As interações entre os propeptídeos C- são estabilizadas pelas ligações dissulfeto entre as cadeias garantindo o alinhamento correto. As duas cadeias pro-α1 e a cadeia pro-α2 então se juntam na direção C- para N- para formar uma hélice tripla (PROCKOP et al., 1989; VAN DIJK et al., 2011a).

Durante a dobragem, o colágeno é modificado por, entre outras, enzimas específicas que hidroxilam resíduos de lisina e prolina e glicosilam resíduos de hidroxilisina. Esta modificação pós-traducional para, quando o conjunto da tripla hélice está completo. O complexo CRTAP / P3H1 / CyPB, codificado pelos genes *CRTAP*, *LEPRE1* e *PPIB*, é responsável pela 3-hidroxilação de pro986, porém, provavelmente, o complexo também age como uma prolina cis-trans isomerase e uma chaperona molecular (ENGEL et al., 1991; ISHIKAWA et al., 2009).

A FKBP65 codificada pelo gene *FKBP10* também atua como uma chaperona molecular para o pró-colágeno tipo I. O produto proteico de *PLOD2* hidroxila o telopeptídeo lisina no retículo endoplasmático rugoso. A HSP47 codificada pelo gene *SERPINH1*, possivelmente, mantém a estabilidade da tripla hélice (VAN DER SLOT et al., 2003; ALANAY et al., 2010; CHRISTIANSEN et al., 2010).

Após o dobramento, as moléculas de pró-colágeno são transportadas através do aparelho de Golgi e da membrana plasmática para a matriz extracelular. Na matriz extracelular, ocorre a clivagem dos propeptídeos N- e C- terminal e as moléculas de colágeno se agregam para formar fibrilas. As ligações transversais covalentes ocorrem dentro e entre as moléculas de colágeno em tripla hélice formando as fibrilas. Essas fibrilas convergem para fibras de colágeno tipo I (Figura 4) (VAN DIJK et al., 2011a).

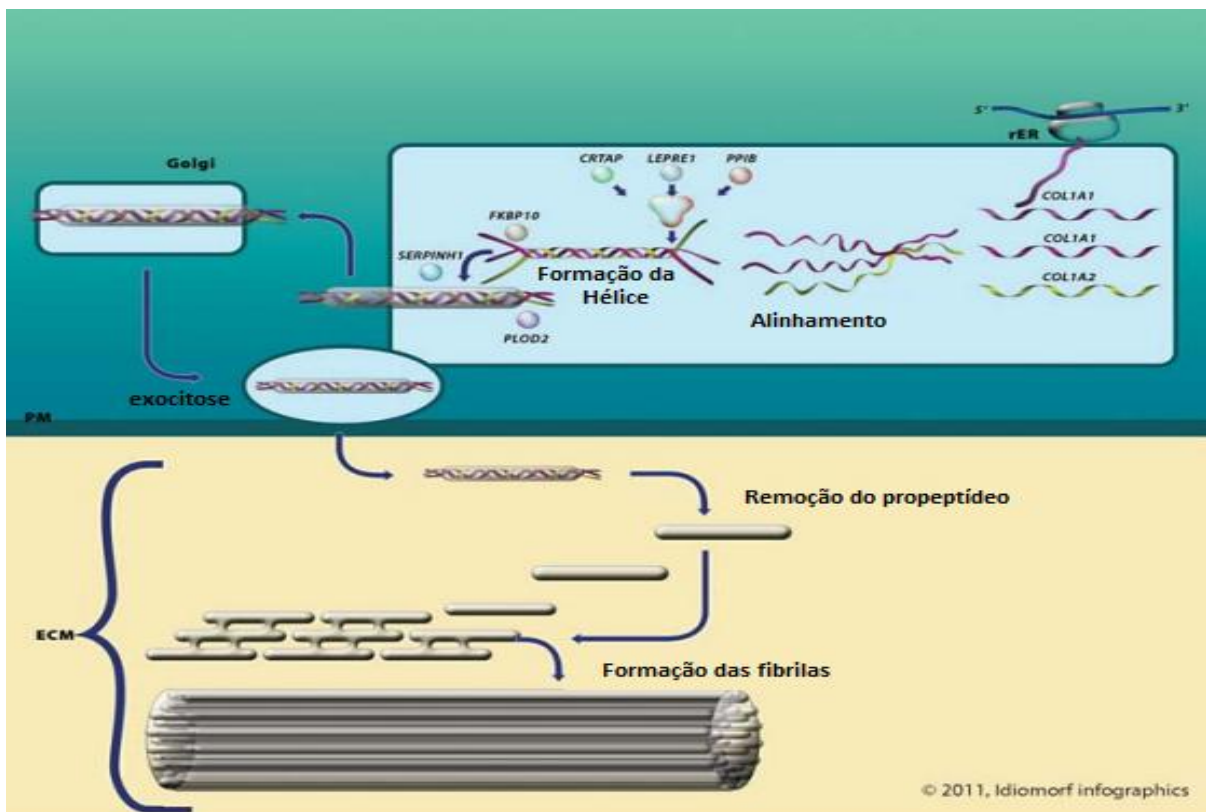


Figura 4. Biossíntese do colágeno tipo I. rER =Retículo endoplasmático rugoso. Golgi = Aparelho de Golgi. PM = Membrana plasmática. ECM = Matriz extracelular. Fonte: adaptada de VAN DIJK, 2011a.

#### 2.4.2 – Mutações na molécula de colágeno tipo I

O colágeno tipo I forma fibrilas de subunidades idênticas, a presença de qualquer alteração na sequência dos resíduos de aminoácidos voltados para o exterior do domínio helicoidal triplo pode interferir na produção de uma estrutura fibrilar normal. As mutações mais conhecidas por resultarem em formas reconhecíveis de OI são substituições de nucleotídeos únicos que alteram um códon de glicina. (BYERS & COLE, 2002). Neste âmbito existem quatro classes gerais de mutação:

(1) aquelas que alteram a quantidade de pró-colágeno tipo I produzido, geralmente consequência de uma mutação sem sentido ou uma mutação de mudança de quadro que introduz um códon de parada prematura na sequência de codificação de um alelo *COL1A1* que leva à produção de apenas cerca de metade da quantidade normal da proteína;

(2) aquelas que alteram a estrutura do domínio triplo-helicoidal do pró-colágeno tipo I, tais mutações geralmente substituem a glicina por outro aminoácido. Qualquer mutação que perturbe a sequência Gly-X-Y da hélice tripla de colágeno resultará em função de colágeno prejudicada. Tais mutações prejudicam a formação da hélice tripla, a sua estabilidade e suas interações com a matriz extracelular;

(3) aquelas que alteram resíduos no propeptídeo carboxi-terminal e influenciam na associação das cadeias;

(4) aquelas que alteram a composição da cadeia do pró-colágeno tipo I diminuindo a produção de cadeias pro- $\alpha$ 2 (I) (BYERS & COLE, 2002).

A distinção mais clara no fenótipo é entre as mutações que diminuem a produção de pró-colágeno tipo I e aquelas que produzem moléculas anormais. Os primeiros resultam no fenótipo de OI tipo I leve, enquanto estes produzem as variedades mais graves de deformação e letais. Para mutações dentro do domínio triplo helicoidal, a natureza do aminoácido substitutivo, a cadeia em que ocorre e a posição na cadeia são todos fatores que contribuem para a gravidade do fenótipo (AMOR et al., 2011).

## 2.5 – GENES ASSOCIADOS À OI COM PADRÃO DE HERANÇA DOMINANTE

### 2.5.1 – COL1A1

O gene *COL1A1* (OMIM 120150), está localizado no cromossomo 17q21.33 e possui 18.609 pares de base distribuídos em 52 éxons e codifica a cadeia de pro-colágeno  $\alpha 1$  da proteína de colágeno tipo I. Chu et al., (1985) foram pioneiros no estudo do gene *COL1A1* descrevendo os limites das regiões 3' e 5' do gene assim como suas regiões promotoras, ajudando a esclarecer toda a sua estrutura.

Uma vez que o colágeno tipo I consiste em duas cadeias pro $\alpha$ -1 e apenas uma cadeia pro $\alpha$ -2, uma mutação no gene *COL1A1* pode afetar a função da molécula de colágeno mais do que uma substituição semelhante no gene *COL1A2*, resultando assim numa forma de OI mais grave, por exemplo (LUND et al., 1997).

São encontradas mutações patogênicas ao longo de todo gene. Atualmente estão descritas junto ao banco de dados *online* da OI o total de 1.018 variantes genéticas distintas para o gene *COL1A1*. As mutações neste gene estão associadas à Osteogênese Imperfeita dos tipos I-IV, Síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIA, síndrome de Ehlers-Danlos tipo clássico, Doença de Caffey e Osteoporose Idiopática (DALGLEISH, 1997, 1998).

### 2.5.2 – COL1A2

O gene *COL1A2* (OMIM 120160) está localizado no Cromossomo 7q21.3, possui aproximadamente 38kb de extensão e é constituído por 52 éxons. É responsável pela síntese da cadeia de pró-colágeno  $\alpha 2$ , uma das subunidades estruturais da tripla hélice do colágeno tipo I. Junien et al. (1982 e 1984), Solomon et al. (1983) e Retief et al. (1985) foram os pioneiros nos estudos do gene determinando sua exata localização no genoma humano.

De acordo com a ferramenta *online* NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), as mutações neste gene estão associadas à Osteogênese Imperfeita

dos tipos I-IV, síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIB, síndrome recessiva de Ehlers-Danlos tipo clássico, osteoporose idiopática e síndrome atípica de Marfan. Os sintomas associados a mutações neste gene, no entanto, tendem a ser menos graves do que as mutações no gene da cadeia  $\alpha 1$  do colágeno tipo I (*COL1A1*), refletindo o papel diferente das cadeias  $\alpha 2$  na integridade da matriz.

Atualmente estão descritas aproximadamente 600 variantes genéticas distintas para o gene *COL1A2*, segundo o banco de dados *online* da Osteogênese Imperfeita (DALGLEISH, 1997; 1998).

Por serem os genes que apresentam maiores taxas de mutações relacionadas a OI, é importante conhecer o padrão de mutações dos genes *COL1A1* e *COL1A2* para possibilitar o desenvolvimento de estratégias otimizadas de diagnóstico molecular desta doença. Além disto, a identificação e posterior validação do gene mutado permite que seja realizado um aconselhamento genético mais eficaz para os familiares dos pacientes, contribuindo com a prevenção de novos casos da doença na população.

### 2.5.3 – *IFITM5*

O gene *IFITM5* (*Interferon-Induced Transmembrane Protein 5*) (OMIM 614757) está localizado no Cromossomo 11p15.5, contém 2 éxons e codifica uma proteína transmembrana de 134 aminoácidos, também chamada de proteína BRIL (*Bone-restricted Iftm-like Protein*). O *IFITM5* é um membro da família dos genes transmembranas induzidos por intéferons.

A proteína BRIL possui dois domínios transmembranas, com extremidades N- e C-terminais extracelulares e uma alça intracelular. Embora o *IFITM5* tenha sido nomeado porque está localizado perto de outros membros da família IFITM e porque ele possui uma estrutura gênica semelhante aos IFITMs, ele não possui elementos de resposta ao intéferon e não é induzido por intéferons. As proteínas IFITM estão envolvidas na sinalização de resposta imune, na maturação de células germinativas e no desenvolvimento (MOFFATT et al., 2008).



A proteína do *IFITM5* também é conhecida como BRIL devido à sua forte expressão nos tecidos ósseos, embora tenha pouca expressão na pele também (MOFFATT et al., 2008).

A função de *IFITM5*/BRIL ainda não é bem clara, mas sugere-se que ela esteja envolvida no processo de formação óssea. Sua expressão de mRNA e localização da proteína são altamente restritas ao tecido esquelético (CHO et al., 2012). Estudos *in vitro* forneceram evidências de que a BRIL desempenha um papel na diferenciação e mineralização dos osteoblastos. A expressão de *IFITM5* aumenta nos osteoblastos até a mineralização inicial e diminui à medida que a mineralização avança (HANAGATA et al., 2007). Outros estudos demonstraram que a expressão de *IFITM5* aumenta de acordo com o tempo de formação de nódulos ósseos e diminui quando os marcadores tardios do desenvolvimento de osteoblastos são expressos, como o *Bglap* (codificando osteocalcina) (HANAGATA et al., 2011).

Moffatt et al. (2008) caracterizaram os padrões de expressão e a localização deste gene *in vitro* e *in vivo* e avaliaram seu papel na mineralização da matriz óssea. Seus estudos mostraram expressão da proteína específica no osso, sem expressão em outros tecidos embrionários ou adultos. Abordagens envolvendo embriões de ratos também mostraram a expressão da proteína nos ossos em desenvolvimento. A triagem de linhagens celulares mostrou que a expressão de Bril é mais alta nos osteoblastos, associada ao início da maturação da matriz / mineralização, sugerindo um papel na formação do osso. A evidência funcional de um papel na mineralização foi demonstrada por estudos *in vivo*. Assim, a Bril foi identificada como uma proteína do osteoblasto com papel crucial na mineralização, apontando uma nova via regulatória na formação óssea.

O *IFITM5* tem um *hotspot* de mutação (c.-14C>T) em sua região 5'-UTR que já foi reportado por diversas vezes na literatura como único causador da OI tipo V (CORRADI et al., 2014; LAZARUS et al., 2014; BRATANIC et al., 2015; BARDAI et al., 2016; LIU et al., 2016; GUAN et al., 2017).

Em 2014, uma nova mutação na região codificante do *IFITM5* foi identificada em pacientes com OI com sintomas mais graves do que os pacientes com OI tipo V (FARBER et al., 2014; GUILLÉN-NAVARRO et al., 2014; HOYER-KUHN et al., 2014). A alteração é uma mutação de novo, autossômica dominante (c.119C> T) e

causa uma substituição do aminoácido serina pela leucina no 40º resíduo da proteína (p.S40L). Pacientes com esta mutação heterozigótica no gene *IFITM5* (*IFITM5*-S40L) apresentam flexão de ossos longos, baixa estatura, curvatura das extremidades, compressão vertebral e escoliose. Além disso, os pacientes exibem esclera azulada e a dentinogênese imperfeita também é observada (HANAGATA, 2016).

Quanto à histologia óssea, são observadas bandas amplas de padrões osteóides não-mineralizados e padrões de escama de peixe. A mutação *IFITM5* c.119C> T causa uma forma grave de OI. Sua patologia difere da OI tipo V causada pela mutação *IFITM5* c.-14C> T (proteína MALEP). Portanto, acredita-se que os quadros de OI causados pelas proteínas *IFITM5*-S40L e MALEP-*IFITM5*, sejam devido a diferentes mecanismos moleculares (HANAGATA, 2016). Essa variante foi reportada 4 vezes no banco de dados *online* da OI.

#### 2.5.3.1 – OI tipo V

Por muitos anos a OI foi dividida nos tipos I-IV, sendo o tipo IV um grupo muito heterogêneo fenotipicamente. Em 2000, Glorieux et al., descreveram sete pacientes tipicamente diagnosticados com OI tipo IV, mas que podiam ser facilmente distinguidos de outros pacientes tipo IV. Essas crianças tinham um histórico de moderada a grave fragilidade de ossos longos e corpos vertebrais.

Quatro delas haviam experimentado pelo menos um episódio de formação de calos hiperplásicos (Figuras 5a e 5b). O histórico familiar foi positivo para OI em três pacientes, com um padrão de herança autossômico dominante. Todos apresentavam limitações na faixa de pronação / supinação em um ou ambos os antebraços, associada a uma calcificação radiologicamente aparente da membrana interóssea (Figuras 5b e 5c).

Três pacientes apresentavam deslocamento anterior da cabeça radial. A densidade mineral óssea da coluna lombar era baixa e similar aos pacientes com mesma idade com OI tipo IV. Nenhum destes pacientes apresentava esclerótica azulada ou dentinogênese imperfeita.

As regiões codificadoras dos dois genes do colágeno tipo I foram triadas a procura de mutações. Nenhuma substituição de glicina ou sítio de *splicing* alterado foram encontrados nestes genes. Estes autores classificaram então estes pacientes como OI tipo V, que se tornou uma nova forma de OI autossômica dominante não associada a mutações no colágeno tipo I (GLORIEUX et al., 2000). A causa genética do tipo V de OI só foi ser descoberta doze anos mais tarde.



Figura 5. Características radiológicas da OI tipo V. a) calo hiperplásico do fêmur. b) membrana interóssea calcificada do antebraço e calo hiperplásico do úmero. c) membrana interóssea calcificada. Fonte: GLORIEUX et al., 2000.

Portanto a OI do tipo V é hoje bem definida como uma forma de OI, com um padrão de herança autossômico dominante, não causada por mutações nos genes do colágeno tipo I, caracterizada pela calcificação da membrana interóssea do antebraço, deslocação da cabeça radial, uma linha metafisária densa, formação de calos hiperplásicos, esclerótica normal e raros casos de dentinogênese imperfeita (CUNDY, 2012).

Cho et al., (2012) e Semler et al., (2012) descobriram, independentemente, a causa genética da OI tipo V. Através do sequenciamento completo do exoma, os dois grupos identificaram uma mesma mutação heterozigota na região 5'-UTR do gene *IFITM5*, uma transição de citosina para timina, 14 pb antecedentes ao códon de

iniciação de tradução (c.-14C>T), em pacientes que apresentavam os sintomas típicos de OI tipo V (Figura 6). Posteriormente realizaram Sequenciamento de Sanger nesta região em outros pacientes com OI tipo V e identificaram a mesma mutação em todos os pacientes.

Logo após, Rauch et al., (2013) sequenciaram 42 pacientes diagnosticados com OI tipo V e todos eles apresentaram a mesma mutação c.-14C>T no gene *IFITM5*. Todos os estudos com pacientes de OI do tipo V publicados desde então, indicam o mesmo diagnóstico molecular.

A mutação c.-14C>T introduz um codón de início prematuro ao quadro de leitura de referência do *IFITM5* e forma uma sequência de Kozak mais forte para início da tradução do que o códon de início normal. Desta forma uma sequência de cinco aminoácidos (Met-Ala-Leu-Glu-Pro), também conhecida como MALEP, é adicionada a porção N-terminal do produto da tradução, aumentando o tamanho da proteína de 137 para 142 aminoácidos e alterando a função do *IFITM5* em indivíduos com a mutação (SEMLER et al., 2012).

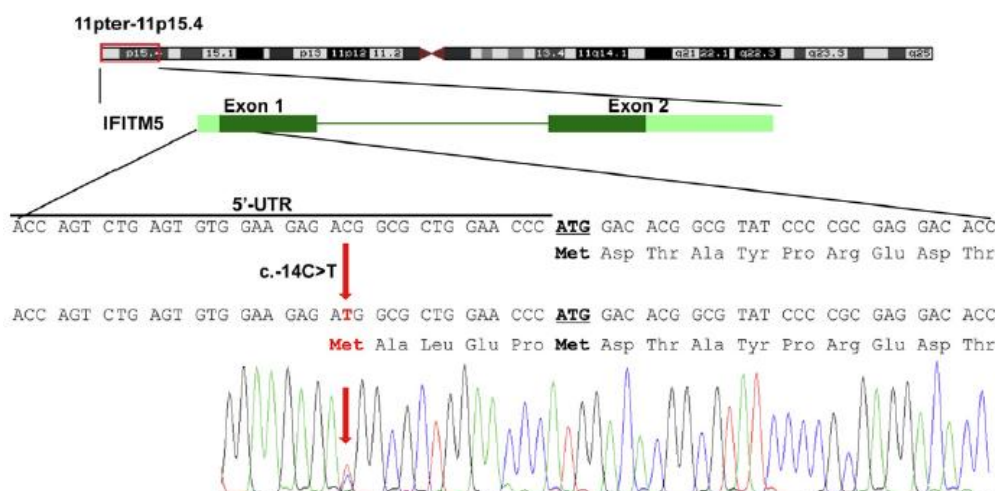


Figura 6. Mutação no *IFITM5* da OI tipo V. Os quadros verdes escuros indicam os éxons codificadores e os quadros verdes claros indicam as regiões UTR. A mutação (c.-14C>T) está indicada pela seta e os cinco aminoácidos adicionados pela mutação estão mostrados abaixo da sequência do gene. Fonte: Cho et al., (2012).

O *IFITM5* mutante parece interferir com a formação óssea normal no tecido ósseo cortical e trabecular, resultando em osteopenia e posterior fragilidade óssea. No entanto, desenvolve a calcificação ectópica de forma consistente na membrana

interóssea do antebraço e de forma menos consistente na região subperióstica dos ossos longos. A formação de calos hiperplásicos é uma resposta exagerada da formação óssea durante a cicatrização óssea e é possivelmente provocada por reação inflamatória pós-traumática. A linha metafisária densa também se desenvolve paradoxalmente nos ossos longos osteopênicos. Portanto, a *IFITM5* mutante com cinco aminoácidos adicionais em seu N- terminal desregula o processo de formação óssea - geralmente suprimindo a formação óssea, mas às vezes, levando ao desenvolvimento de calcificação ectópica ou formação óssea exagerada em um determinado local ou em certa situação (CHO et al., 2012).

Ao contrário dos indivíduos com OI relacionada ao colágeno tipo I, os indivíduos com OI tipo V apresentam uma textura relativamente normal dos tecidos moles, ausência de dentinogênese imperfeita e envolvimento de tecido conjuntivo não calcificado como a membrana interóssea do antebraço. Esses achados indicam que OI tipo V pode ser uma desordem da deposição óssea esquelética em vez de uma doença de tecido conectivo generalizado (CHO et al., 2012).

A nível celular, culturas de osteoblastos primários de pacientes com OI tipo V mostram mineralização aumentada concomitantemente com o aumento dos marcadores de diferenciação de osteoblastos, mas a expressão do colágeno tipo I é reduzida e a aparência das fibrilas é alterada (REICH et al., 2015).

Blouin et al. (2017) mediram a densidade e mineralização óssea em amostras de biópsia óssea de pacientes com OI tipo V. Chegaram a conclusão de que o material ósseo de pacientes com OI tipo V é hipermineralizado, semelhante a outras formas de OI.

A densidade elevada das lacunas dos osteócitos em conexão com a falta de lamelação óssea regular aponta para uma formação óssea primária exuberante e alteração do processo de remodelação óssea em OI tipo V. Coletivamente, isso poderia indicar uma disfunção dos osteoblastos consistente com a atividade intracelular defeituosa da mutante MALEP-BRIL (BLOUIN et al., 2017).

Deve notar-se que tais características ósseas também foram parcialmente descritas em outras formas de OI, portanto ainda não está totalmente claro como a mutação heterozigótica em BRIL resulta no fenótipo de OI tipo V.

## 2.6 – GENES ASSOCIADOS À OI COM PADRÃO DE HERANÇA RECESSIVO

O gene *SERPINF1*, *serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1* (OMIM 172860) possui oito éxons e está localizado no cromossomo 17p13.3. Codifica a proteína PEDF (*Pigment Epithelium-Derived Factor*), e é responsável pela OI tipo VI, na qual ocorre defeito na mineralização primária indicando um papel crítico da PEDF na mineralização durante a formação óssea (RAUCH et al., 2012; CRAWFORD et al., 2013; AL-JALLAD et al., 2014; GLORIEUX et al., 2014).

O gene *CRTAP* (*cartilage associated protein*) (OMIM 605497) codifica a proteína CRTAP e está localizado no cromossomo 3p22.3, possui aproximadamente 6kb de extensão e é constituído por sete éxons. Forma um complexo com os genes *LEPRE1* (*prolyl 3-hydroxylase-1*) e *PPIB* (*cyclophilin-B*) que catalisa uma modificação pós-traducional específica: a 3-hidroxilação da prolina 986 da cadeia de pró-colágeno  $\alpha 1(I)$  e causa o tipo VII de OI. (FRATZL-ZELMAN et al., 2010; VALLI et al., 2012).

O gene *LEPRE1* (*prolyl 3-hydroxylase 1*) (OMIM 610339) possui 15 éxons e está localizado no cromossomo 1p34.1. Codifica a proteína P3H1, localizada no retículo endoplasmático, cuja atividade é fundamental para a perfeita síntese e montagem da molécula do colágeno tipo I. Forma um complexo com os genes *CRTAP* (*cartilage associated protein*) e *PPIB* (*cyclophilin-B*). Causa o tipo VIII de OI. (VAN DIJK et al., 2011b; TAKAGI et al., 2012; MOUL et al., 2013; PEPIN et al., 2013). A falta de P3H1, devido a mutações em *LEPRE1*, resulta em OI recessiva grave, que é muitas vezes letal no período perinatal e se assemelha aos tipos II e III de OI (BALDRIDGE et al., 2008; WILLAERT et al., 2009).

O gene *PPIB* (*peptidyl-prolyl isomerase B*) (OMIM 123841) possui cinco éxons e está localizado no cromossomo 15q21-q22. Codifica a proteína ciclofilina B (CyPB) e forma um complexo com os genes *LEPRE1* e *CRTAP*. Mutações neste gene causam o tipo IX de OI. A falta de CyPB está associada com níveis de 3-hidroxilação de Pro986 da  $\alpha 1(I)$  variando de 1/3 a normal, bem como modificação helicoidal normal da molécula de colágeno (PYOTT et al., 2011; ISHIKAWA et al., 2012).

O gene *SERPINH1* (*serpin peptidase inhibitor, clade H, member 1, (collagen binding protein 1)*) (OMIM 600943), possui cinco éxons e está localizado no cromossomo 11q13.5. Codifica a Hsp47 (*Heat-Shock Protein 47*). Essa proteína se encontra no retículo plasmático atuando como uma chaperona molecular na biossíntese do colágeno (CHRISTIANSEN et al., 2010). Causa o tipo X de OI, caracterizado por deformidade esquelética grave, esclera azulada, dentinogênese imperfeita, anormalidades cutâneas e hérnia inguinal (MARINI et al., 2017)

O gene *FKBP10* (*FK506 binding protein 10*) (OMIM 607063) possui dez éxons e está localizado no cromossomo 17q21.2. Codifica a proteína de ligação FKBP65, uma PPIase presente no retículo endoplasmático que atua como uma chaperona por participar do dobramento do colágeno tipo I (PATTERSON et al.; 2000). A deficiência de FKBP65 provoca o tipo XI de OI e foi relatada pela primeira vez em 2010 em casos de OI com deformidade progressiva (ALANAY et al., 2010).

O gene *PLOD2* (*procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2*) (OMIM 601865) possui vinte éxons e está localizado no cromossomo 3q24. Codifica a Lisil - hidroxilase 2 (LH2), enzima responsável pela hidroxilação dos resíduos de lisina do telopeptídeo C- terminal do colágeno tipo I, crucial para a formação das ligações cruzadas intermoleculares maduras no osso e na cartilagem (VAN DER SLOT et al., 2003; HA-VINH et al., 2004; ALANAY et al., 2010).

O gene *BMP1* (*bone morphogenetic protein 1*) (OMIM 112264) possui vinte e dois éxons, 46kb de extensão, está localizado no cromossomo 8p21.3 e codifica a proteína BMP1. Essa proteína funciona como proteinase da porção c-terminal dos pró-colágenos tipos I a III e atua sobre outros substratos da ECM. Causa o tipo XII de OI e seu fenótipo caracteriza-se por numerosas fraturas, baixa estatura com rizomelia, deformidade dos membros e cifoescoliose variável (KANG et al., 2017).

O gene *SP7* (*SP7 transcription factor*) (OMIM 606633) possui três éxons e está localizado no cromossomo 12q13.13. Codifica a proteína SP7, também conhecida como Osterix, um fator de transcrição específico de osteoblastos que contém três domínios de ligação ao DNA na extremidade C- terminal, essencial para a formação óssea. A displasia óssea gerada por mutações no *SP7* é referida como OI tipo XIII. (LAPUNZINA et al., 2010; KANG et al., 2017).

O gene *TMEM38B* (*transmembrane protein 38B*) (OMIM 611236) possui seis éxons e está localizado no cromossomo 9q31.1-31.3. Codifica a proteína *TRIC-B*. (SHAHEEN et al., 2012). Indivíduos que possuem mutação em *TMEM38B*, apresentam fenótipo ósseo moderadamente severo, com curvatura e fragilidade de ossos longos levando a múltiplas fraturas na infância. Escleróticas azuladas, porém dentes, faces e audições normais foram relatados (SHAHEEN et al., 2012; VOLODARSKY, 2013).

O gene *WNT1* (*wingless-type mmtv integration site family, member 1*) (OMIM 164820) está localizado no cromossomo 12q13.12, possui quatro éxons e codifica a proteína WNT1. Mutações homozigóticas sem sentido em *WNT1* causam o tipo XV de OI recessiva, que apresenta fragilidade óssea grave e progressiva, deformidade dos ossos longos, osteopenia, baixa estatura e cifoescoliose. (FAHIMINIYA et al., 2013; KEUPP et al., 2013; LAINE et al., 2013; PYOTT et al., 2013; MAKITIE et al., 2016).

O gene *CREB3L1* (*cAMP response element-binding protein 3-like 1*) (OMIM 616215) possui 13 éxons e está localizado no cromossomo 11p11.2. Codifica a proteína OASIS. Estudos sugerem que essa proteína regula o desenvolvimento esquelético por mecanismos dependentes e independentes de osteoblastos e sugerem que sua deficiência gera um impacto específico no osso (MURAKAMI et al., 2009; 2011).

O gene *SPARC* (*secreted protein, acidic, cysteine-rich*) (OMIM 182120) possui dez éxons e está localizado no cromossomo 5q33.1. Codifica a osteonectina, uma glicoproteína que se liga ao colágeno e outras proteínas da ECM. (ROSSET & BRADSHAW, 2016). No osso, *SPARC* é expresso nos osteoblastos (KANG et al., 2017). Em apoio a atividade de *SPARC* como uma chaperona intracelular de colágeno tipo I, células com mutações em *SPARC* mostram um defeito na secreção de colágeno (MENDOZA-LONDONO et al., 2015).

Recentemente, foi identificada a primeira forma de OI recessiva ligada ao cromossomo X. Mutações missense foram encontradas no gene *MBTPS2* em dois grupos de OI independentes, com aparente herança ligada ao X (LINDERT et al., 2016). Os homens afetados possuem OI moderada a grave com fraturas pré e pós-natal dos ossos longos e costelas, baixa massa óssea, deformidade óssea,



escoliose e deformidade torácica. Eles têm escleras brancas ou azuladas e dentes normais (KANG et al., 2017).

O gene *MBTPS2* (*membrane-bound transcription factor protease, site 2*) (OMIM 300294) está localizado no cromossomo Xp22.11-p22.13 e codifica uma metaloprotease de zinco ligada a membrana de 519 aminoácidos, S2P (*protease site 2*) (ZELENSKI et al., 1999).

### 3 – OBJETIVOS

#### 3.1 – OBJETIVO GERAL

Caracterizar o padrão de mutações nos genes *IFITM5*, *COL1A1* e *COL1A2* em pacientes com OI do Espírito Santo.

#### 3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar mutações no gene *IFITM5* nos pacientes com OI que não obtiveram resultado molecular para outros genes envolvidos na doença;
- Validar mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* que foram previamente identificadas por NGS em pacientes com OI do Espírito Santo;
- Caracterizar o padrão de mutações nos genes *IFITM5*, *COL1A1* e *COL1A2* em pacientes com OI do Espírito Santo.

## 4 – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Amostra

Foram coletadas amostras, inicialmente, de 31 pacientes não aparentados que apresentavam diagnóstico clínico de OI atendidos no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória/ES (Tabela 1). O diagnóstico e classificação da OI, para cada paciente, foram estabelecidos por um corpo clínico especializado, com base nos achados clínicos e radiológicos, incluindo histórico familiar e ocorrência de fraturas ósseas. Foi adotada a classificação clínica tradicional descrita por Silience et al. (1979) que inclui os tipos I, II, III e IV.

Tabela 1. Amostra inicial do estudo.

Paciente	Tipo de OI	Caso Familiar
P.1	III	Não
P.2	I	Sim
P.3	IV	Não
P.4	I	Sim
P.5	IV	Não
P.6	III	Não
P.7	I	Não
P.8	I	Sim
P.9	I	Sim
P.10	III	Sim
P.11	I	N/I
P.12	I	Sim
P.13	I	Sim
P.14	III	Não
P.15	IV	Não
P.16	IV	Não
P.17	I	Não
P.18	I	Não
P.19	I	Sim
P.20	IV	Não
P.21	III	Não
P.22	III	Não
P.23	III	Não
P.24	III	Não
P.25	III	Não
P.26	III	Sim
P.27	IV	Não
P.28	IV	Não
P.29	III	Não
P.30	I	Não
P.31	III	Sim

N/I: Sem informação

Estudos moleculares prévios analisaram os genes *COL1A1*, *COL1A2*, *LEPRE 1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7* e *WNT1* envolvidos na OI nestes pacientes por meio da técnica de NGS. Estes estudos identificaram 17 mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* em 16 indivíduos da amostra (Tabela 2). Esta técnica apontou duas mutações, uma no gene *COL1A1* e outra no *COL1A2*, em um mesmo paciente (P.31). No presente trabalho foi realizado um estudo de validação destas 17 mutações identificadas por NGS.

Tabela 2. Mutações encontradas nos genes *COL1A1* e *COL1A2* em estudos prévios por NGS.

Paciente	Gene	Exon/Intron	Mutação (cDNA)	Mutação (Proteína)	Zigozidade
P.1	<i>COL1A1</i>	Exon 8	c.608G>T	p.Gly203Val	Heterozigoto
P.2	<i>COL1A1</i>	Exon 13	c.887G>T	p.Gly296Val	Heterozigoto
P.5	<i>COL1A1</i>	Exon 18	c.1165G>T	p.Gly389Cys	Heterozigoto
P.7	<i>COL1A1</i>	Exon 32	c.2165G>C	p.Gly722Ala	Heterozigoto
P.8	<i>COL1A1</i>	Exon 37	c.2523delT	p.(Gly842Alafs*266)	Heterozigoto
P.11	<i>COL1A1</i>	Exon 44	c.3162delT	p.(Gly1055Alafs*53)	Heterozigoto
P.13	<i>COL1A1</i>	Exon 45	c.3235G>A	p.Gly1079Ser	Heterozigoto
P.15	<i>COL1A2</i>	Intron 14	c.693+2T>C	Sítio de Splicing	Heterozigoto
P.17	<i>COL1A2</i>	Exon 34	c.2027G>A	p.Gly676Asp	Heterozigoto
P.18	<i>COL1A2</i>	Exon 38	c.2314G>A	p.Gly772Ser	Heterozigoto
P.19	<i>COL1A2</i>	Exon 38	c.2314G>A	p.Gly772Ser	Heterozigoto
P.20	<i>COL1A2</i>	Intron 40	c.2565+1G>A	Sítio de Splicing	Heterozigoto
P.21	<i>COL1A2</i>	Exon 40	c.2458G>A	p.Gly820Ser	Heterozigoto
P.22	<i>COL1A2</i>	Exon 49	c.3278G>A	p.Gly1093Asp	Heterozigoto
P.23	<i>COL1A2</i>	Exon 49	c.3296G>C	p.Gly1099Ala	Heterozigoto
P.31	<i>COL1A1</i>	Exon 40	c.2750delG	p.(Gly917Aspfs*191)	Heterozigoto
	<i>COL1A2</i>	Exon 37	c.2207G>T	p.Gly736Val	Heterozigoto

Quatro pacientes tiveram resultados moleculares inconclusivos para os genes previamente estudados por NGS. Estes pacientes foram selecionados para estudo do gene *IFITM5*, que apresenta, segundo Bardai et al., (2016), taxa significativa de mutações em pacientes com OI. Além disto, outros quatro pacientes que ainda não haviam sido estudados foram incluídos na amostra, totalizando oito pacientes para o estudo do gene *IFITM5* (tabela 3).

Tabela 3: Dados clínicos dos pacientes estudados para o gene *IFITM5*

Paciente	Sexo	Idade	Tipo de OI	Nº de fraturas	Severidade
P.24	M	15	III	incontáveis	moderada
P.26	F	2	III	2	moderada
P.28	F	11	IV	21	moderada
P.30	M	17	I	13	moderada
P.32	M	15	III	incontáveis	grave
P.33	M	19	I	4	leve
P.34	F	21	I	4	leve
P.35	M	8	I	5	leve

#### 4.2 Coleta e Extração de DNA

Foram coletados 5 mL de sangue periférico dos indivíduos da amostra em tubos de coleta a vácuo contendo EDTA 5%. A técnica de extração de DNA foi realizada com base em metodologia previamente descrita e adaptada (MILLER et al., 1988). Os DNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro *NanoDrop<sup>TM</sup> 1000<sup>®</sup>* (Thermo Scientific, USA) e diluídos para a concentração de 20ng/μL em água ultrapura.

#### 4.3 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR, utilizando-se *primers* específicos para as regiões de interesse dos genes *IFITM5*, *COL1A1* e *COL1A2*, com base em metodologias previamente descritas (INNIS et al., 1995). Para esta técnica foi utilizado Termociclador *Verity<sup>®</sup> Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*, USA).

##### 4.3.1 – PCR do gene *IFITM5*

Para amplificação da região 5'-UTR, próxima ao éxon 1, local de *hotspot* de mutações do gene *IFITM5*, foram desenhados *primers* específicos que anelassem nesta região de interesse do gene. Para desenho dos *Primers* foram utilizadas as

ferramentas online *Primer3* (v. 0.4.0) e *Primer-BLAST*. A amplificação desta região gerou um fragmento de DNA de 309pb (Quadro 3).

Quadro 3. Relação de *Primers* Utilizados no Estudo do Gene *IFITM5*

<b>Primer</b>	<b>Sequência do primer (5'-3')</b>	<b>Fragmento</b>
<i>forward</i>	ACAGGGCTATAAGTGAGCGG	309pb
<i>reverse</i>	TGATGGAGTAGTGGAGCCTC	

As concentrações de reagentes para amplificação obedeceram as recomendações do fabricante da enzima Taq Polimerase Recombinant BR (*Invitrogen*<sup>TM</sup>, BR) e estão ilustradas na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações de reagentes para PCR do gene *IFITM5*

<b>Reagente</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume</b>
<b>10X PCR Buffer</b>	1x	1 µl
<b>MgCl<sub>2</sub> 50mM</b>	1,5mM	0,3µl
<b>dNTP 10mM</b>	0,2mM	0,2µl
<b>Primer Forward 10 µM</b>	0.4mM	0,4µl
<b>Primer Reverse 10 µM</b>	0.4mM	0,4µl
<b>Taq DNA pol. (5U/µL)</b>	1U	0,1µl
<b>DNA 20ng/µL</b>	40ng	1µl
<b>H<sub>2</sub>O ultrapura</b>	-----	6,6 µl
<b>Total</b>	-----	10µl

As condições ideais das etapas de amplificação do DNA incluindo tempo/temperatura e número de ciclos estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Padronização da técnica de PCR para o gene *IFITM5*

<b>Desnaturação Inicial</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Extensão Final</b>	<b>Ciclos</b>
94°C 5min	94°C 30s	62°C 30s	72°C 30s	72°C 5min	30

4.3.2 – PCR dos genes *COL1A1* e *COL1A2*

Os *primers* utilizados (Quadro 4) e as condições das etapas de amplificação (Tabela 6) dos fragmentos dos genes *COL1A1* e *COL1A2* foram previamente descritos por Moraes (2011) e Almeida (2011). As concentrações de reagentes foram as mesmas utilizadas para o estudo do gene *IFITM5*, com exceção das concentrações de  $MgCl_2$  e presença de Dimetilsulfóxido (DMSO).

Quadro 4. Relação de *Primers* Utilizados no Estudo dos Genes *COL1A1* e *COL1A2*

Gene	Região	Primer	Sequência do <i>primer</i>	Fragmento
<i>COL1A1</i>	Éxon 8	<i>forward</i>	TGGAGGGAAGACTGGGATGAG	247pb
		<i>reverse</i>	AAGACCCAGGCCTGGGAGTTCTTCT	
<i>COL1A1</i>	Éxon 13	<i>forward</i>	GTAAGAGGCTGTCTGAACATC	228pb
		<i>reverse</i>	GTCAGATGAGATGGGAGACAGC	
<i>COL1A1</i>	Éxon 18	<i>forward</i>	TAAGTGTCCCCGACTCAGTGTC	220pb
		<i>reverse</i>	AGCCAGGGCGTGACGTAGGAG	
<i>COL1A1</i>	Éxon 32	<i>forward</i>	TTTCTCAAGGCTTGTCGTTGGCCTTG	291pb
		<i>reverse</i>	GATTCAAAGGAGGCAGAGATGGGAGC	
<i>COL1A1</i>	Éxon 36	<i>forward</i>	CCCTGTCTGTGCCTTCACCCCTTGC	249pb
		<i>reverse</i>	CTTCTCCCCTGAGGATGGCTGAC	
<i>COL1A1</i>	Éxon 40	<i>forward</i>	GTGGGGGCTGCCAGAAGGATG	337pb
		<i>reverse</i>	TGAGGTGCCAGACAGCAGCACAG	
<i>COL1A1</i>	Éxon 44	<i>forward</i>	GCAACTCCATGACCACAGC	304pb
		<i>reverse</i>	CCTGCCTGGGTGAAGTCCGAC	
<i>COL1A1</i>	Éxon 45	<i>forward</i>	GGAGAGAGAGATCCAGCAGAGGGGA	246pb
		<i>reverse</i>	GGGACAACTGTCAGGCGGAAGTTC	
<i>COL1A2</i>	Éxon 37	<i>forward</i>	AGTGGGTCGGAATACCAGAGCTGT	334pb
		<i>reverse</i>	TCCCTGTTGCATAGCAGGCACT	
<i>COL1A2</i>	Íntron 14	<i>forward</i>	GCAAATGATGCCTGTGACTTT	297pb
		<i>reverse</i>	TCCTTTCAAACCTCCCCAGTG	
<i>COL1A2</i>	Éxon 34	<i>forward</i>	CCAACCAGAGTGCAGTGAAAGTGT	265pb
		<i>reverse</i>	GCCATAAAAATGAATTGCTGGGGCTC	
<i>COL1A2</i>	Éxon 38	<i>forward</i>	AGAGATGCGGAATGATCCACTTG	373pb
		<i>reverse</i>	TGCCTAGGGCCACCTTGTT	
<i>COL1A2</i>	Íntron/ Éxon 40	<i>forward</i>	GAATCTTTGCTGCTCTCTTCCAGGC	312pb
		<i>reverse</i>	GCCACTTGAAGATTTGTGTAGGGGCT	
<i>COL1A2</i>	Éxon 49	<i>forward</i>	TGCTGCCATGGATGTCTCTCACTGT	380pb
		<i>reverse</i>	TGAAAAGCTCAACTTGTGAGAAGGGTCA	

Tabela 6. Condições das etapas de amplificação dos fragmentos dos genes *COL1A1* e *COL1A2*, concentração de  $MgCl_2$  e de DMSO utilizadas na PCR.

Gene	Região	DI	D.	Anelamento	E.	EF	Ciclos	$MgCl_2$	DMSO
<i>COL1A1</i>	Éxon 8			67°C / 30s			30	2.50mM	-
<i>COL1A1</i>	Éxon 13			66°C / 30s			30	3.50mM	5%
<i>COL1A1</i>	Éxon 18			67°C / 30s			30	2.50mM	-
<i>COL1A1</i>	Éxon 32			61°C / 30s			25	2.50mM	5%
<i>COL1A1</i>	Éxon 36			67°C / 30s			25	2.50mM	-
<i>COL1A1</i>	Éxon 40			72°C / 30s			27	1.25mM	-
<i>COL1A1</i>	Éxon 44			68°C / 30s			30	3.50mM	5%
<i>COL1A1</i>	Éxon 45	94°C 5min	94°C 30s	72°C / 30s	72°C 30s	72°C 5min	30	2.50mM	5%
<i>COL1A2</i>	Éxon 37			72°C / 30 s			25	3,50mM	-
<i>COL1A2</i>	Íntron 14			64°C / 30 s			25	3,50mM	-
<i>COL1A2</i>	Éxon 34			72°C / 30 s			25	3,50mM	-
<i>COL1A2</i>	Éxon 38			57°C / 30 s			25	1,50mM	-
<i>COL1A2</i>	Íntron/ Éxon 40			72°C / 30 s			25	2.50mM	-
<i>COL1A2</i>	Éxon 49			72°C / 30 s			25	1,50mM	-

DI: Desnaturação Inicial. D: Desnaturação. E: Extensão. EF: Extensão Final

#### 4.4 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Para verificar a amplificação dos fragmentos foi utilizada técnica de eletroforese em gel a fim de se detectar a ocorrência de uma única banda de tamanho esperado, quando comparada com um padrão de peso molecular. Dois microlitros de Gel *Loading Buffer* (Bromofenol Blue 0.25%; Sacarose 40%) foram adicionados a cinco microlitros de cada amostra amplificada pela PCR e aplicados em gel de Poliacrilamida 7% [9.0mL de poliacrilamida 40%; 5.0mL de tampão TBE 10X (890mM Tris base, 890mM ácido bórico; 20mM EDTA; pH8.0), acrescidos de 350µL de APS 10% (persulfato de amônio) e 35µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), completando com água destilada até 50mL]. A voltagem padrão utilizada foi de 240V durante 90 minutos. A coloração do gel foi executada com base em metodologia já descrita até a visualização das bandas (BASSAM et al., 1991; SANGUINETTI et al., 1994).



#### 4.5 – Sequenciamento de Sanger

Após amplificação das amostras e verificação das bandas em gel de poliacrilamida as mesmas foram processadas para sequenciamento seguindo protocolo do fabricante utilizando a enzima *Illustra™ ExoProStar™*.

A plataforma de sequenciamento utilizada foi a ABI PRISM® 3100 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, USA) e o kit utilizado para a reação de sequenciamento foi o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, do mesmo fabricante.

Para a purificação dos produtos de PCR foi feito um mix contendo: 5µl de produto de PCR, 1µl da enzima ExoProStar e 1µl de fosfatase alcalina. O mix foi levado ao termociclador e submetido à temperatura de 37°C por 15 minutos e depois a 80°C por mais 15 minutos.

Após a purificação foi realizada a reação de sequenciamento contendo: 4µl do produto previamente purificado, 0,32µl do *primer reverse* desenhado, 1,68µl de H<sub>2</sub>O ultrapura, 3,5µl de *buffer* do *Big Dye* e 0,5µl de *Big Dye*. A reação de sequenciamento foi levada novamente ao termociclador seguindo as seguintes condições: 96°C por 1 minuto, 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos, sendo as três últimas etapas repetidas 25 vezes.

Para a precipitação utilizou-se o seguinte protocolo: a) Aos 10µl da reação de sequenciamento adicionar: 2 µl de Acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2 µl de EDTA 125mM pH 8,0; b) Vortexar rapidamente; c) Adicionar 50 µl de etanol 100%; d) Vortexar rapidamente; e) Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos; f) Centrifugar por 20 minutos a 14 000 rpm; g) Cuidadosamente aspirar o sobrenadante com uma pipeta e descartá-lo; h) Adicionar ao pellet 250 µl de etanol 70%; i) Vortexar rapidamente; j) Centrifugar por 10 minutos a 14 000 rpm; l) Cuidadosamente aspirar o sobrenadante com um pipeta e descartá-lo; m) Repetir os passos j e l; n) Secar as amostras em termociclador por 3min a 80°C; o) Armazenar em geladeira e protegido da luz até o processamento.

Após preparo das reações para o sequenciamento, as mesmas foram encaminhadas ao serviço de sequenciamento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Gerados os eletroferogramas de sequenciamento dos pacientes, os mesmos foram analisados e comparados à sequência referência, disponível na ferramenta *online* “*Ensembl Genome Browser*”. As alterações encontradas foram comparadas as alterações descritas junto ao banco de dados *online* da Osteogênese Imperfeita para o gene *IFITM5*.

Para os genes *COL1A1* e *COL1A2* as sequências obtidas pelo Sequenciamento de Sanger foram comparadas àquelas identificadas previamente pelo sequenciamento por NGS. O estudo de validação de mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* foi realizado em colaboração com a aluna de Ciências Biológicas Jéssica de Azeredo Mello Soares que participa do Programa Institucional de Iniciação Científica da UFES.

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos e todos os pacientes que participaram, ou seu representante legal, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item será apresentado sob forma de artigo científico submetido à Revista *Genetics and Molecular Biology*, classificação Qualis Capes B1, na área de Biotecnologia.

As contribuições deste trabalho de mestrado para o artigo foram: o estudo do gene *IFITM5*, a identificação da mutação c.-14C>T neste gene, do paciente P.24 e a validação dos resultados de NGS para os genes *COL1A1* e *COL1A2* por meio de Sequenciamento de Sanger.

 Genetics and Molecular Biology[Home](#)[Author](#)[Review](#)

# Submission Confirmation

[Print](#)

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Genetics and Molecular Biology

**Manuscript ID**

GMB-2018-0043

**Title**

OSTEOGENESIS IMPERFECTA IN BRAZILIAN PATIENTS

**Authors**

Trancozo, Malra

Morales, Marcos Vinicius

Silva, Dailia

Soares, Jéssica

Barbtrato, Clara

de Almeida, Márcio

Santos, Ligia

Rebouças, Maria Regina

Akel Jr, Akel

Sipolatti, Valentin

Nunes, Vanda Regina

Errera, Flávia

Aguena, Melre

Passos-Bueno, Maria Rita

Paula, Flávia

**Date Submitted**

09-Feb-2018

## OSTEOGENESIS IMPERFECTA IN BRAZILIAN PATIENTS

Maira Trancozo<sup>1,2\*</sup>, Marcos V.D. Moraes<sup>1,2\*</sup>, Dalila A. Silva<sup>1,2</sup>, Jéssica A.M. Soares<sup>1</sup>, Clara Barbirato<sup>1</sup>, Márcio G. Almeida<sup>1</sup>, Lígia R. Santos<sup>1,2</sup>, Maria R. G. O. Rebouças<sup>3</sup>, Akel N. Akel Jr<sup>3</sup>, Valentim Sipolatti<sup>3</sup>, Vanda R. R. Nunes<sup>3</sup>, Flavia I. V. Errera<sup>2,4</sup>, Meire Agúena<sup>5</sup>, Maria R. Passos-Bueno<sup>5</sup>, Flavia de Paula<sup>1,2</sup>

\* Maira Trancozo, and Marcos Vinicius Dornelas de Moraes contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil.

<sup>3</sup>Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória, ES, Brasil.

<sup>4</sup>Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, ES, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

**RUNNING TITLE: OI in Brazilian Patients**

Keywords: NGS; *COL1A1/COL1A2* genes; *FKBP10* gene; *P3H1* gene; *IFITM5* gene

## ABSTRACT

Osteogenesis Imperfecta is a heterogeneous genetic disorder characterized by bone fragility and fracture. Mutations in 17 distinct genes can cause Osteogenesis Imperfecta, and therefore, the molecular diagnosis of OI is frequently difficult to analyze and expensive. Studies that report the most frequently mutated genes in OI patients can help to improve molecular strategies for diagnosis of the disease. In order to characterize the mutation profile of OI in Brazilian patients, we analyzed 30 unrelated patients through single strand conformation polymorphism (SSCP) screening, next-generation sequencing (NGS) and/or Sanger sequencing for the 11 most frequently mutated genes in the database of mutations, including *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* and *IFITM5*. Disease-causing variants were identified in *COL1A1*, *COL1A2*, *FKBP10*, *P3H1* and *IFITM5* genes. A total of 28 distinct mutations were identified, including 7 novel changes. Our data show that the analysis of these five genes is able to detect up to 95% of causative mutations in Osteogenesis Imperfecta disorder from Brazilian population. However, it has to be taken into considerations that distinct populations can have different proportions of disease-causing variants. Hence, it is important to replicate this study in other groups.

## 1. INTRODUCTION

Osteogenesis Imperfecta (OI) is a heterogeneous group of connective tissue syndromes characterized by abnormal bone fragility that leads to fractures and skeletal deformities. The prevalence of OI is estimated to be 1/15,000 [Folkestad et al., 2016]. Because of its wide clinical variability, patients can also develop short stature, dentinogenesis imperfecta, blue sclera and hearing loss [van Dijk et al., 2010]. The phenotypic spectrum of OI may overlap with other skeletal diseases, which makes the establishment of a precise diagnosis based on clinical, radiological and genetic investigations extremely difficult. Based on clinical diagnosis, including pre- and postnatal severity of bone fragility, the traditional classification distinguishes four phenotypic groups (OI types I to IV). OI type I is the mildest phenotype, OI type II is lethal in the neonatal period, OI type III is the most severe form compatible with postnatal survival, and OI type IV represents a moderate form of severity [Sillence et al., 1979]. However, an expanded classification has been suggested based on the phenotype and the mutated gene [Marini et al., 2017].

OI-like syndromes with a dominant or recessive pattern of inheritance can be associated with up to seventeen genes [Kang et al., 2017]. A large proportion of OI cases that segregate in an autosomal dominant pattern are due to heterozygous mutations in the structural genes coding for the two procollagen chains, *COL1A1* (OMIM 120150) and *COL1A2* (OMIM 120160), that form type I collagen structure, the main protein of bone, tendons and cartilage [Van Dijk et al., 2010]. In addition, mutations in *IFITM5* (OMIM 614757), the gene encoding BRIL, a transmembrane protein enriched in osteoblasts during mineralization, are less frequent but are also related [Cho et al., 2012; Semler et al., 2012; Hanagata, 2016].

Unlike the autosomal dominant pattern of inheritance, those individuals who do not have a mutation in one of the structural collagen genes might have recessive mutations in other loci. The number of genes discovered that may lead to recessive phenotypes have increased dramatically [Kang et al., 2017; Marini et al., 2017]. Among them, there are the following genes: *CRTAP* (OMIM 605497), *P3H1* (OMIM 610339), *PPIB* (OMIM 123841), *SERPINH1* (OMIM 600943), *FKBP10* (OMIM 607063), *SERPINF1* (OMIM 172860), *SP7/OSX* (OMIM 606633), *PLOD2* (OMIM 609220), *BMP1* (OMIM 614856), *TMEM38B* (OMIM 615066), *WNT1* (OMIM 615220), *CREB3L1* (OMIM 616229), *SPARC* (OMIM 616507), *MBTPS2* (OMIM 300294).

Mutations in these genes can cause abnormal i) collagen pos-translational modification, ii) collagen processing and crosslinking modification, ii) bone mineralization, or iii) osteoblast differentiation and function [Marini et al., 2017].

According to the best practice guidelines for laboratory diagnosis of OI, Sanger sequencing of relevant genes is the gold standard [Van Dijk et al., 2012]. Given the large number of suspected genes linked to OI and its phenotypic heterogeneity, Sanger sequencing of various genes might increase the sensitivity of molecular diagnosis of a disease. However, the procedure is not only expensive but also laborious and very time-consuming. The emergence of new technologies for high-throughput capture and the possibility of the inclusion of a maximum number of genes into a sequencing panel has made next-generation sequencing (NGS) one of the most promising techniques for molecular diagnostic purposes [Árvai et al., 2016; Sule et al., 2013].

Herein, we present the results of the analysis of 30 individuals with typical OI phenotype from Brazilian population through single strand conformation polymorphism (SSCP) screening, NGS techniques and Sanger sequencing for the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* and *IFITM5* genes.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 SUBJECTS**

A total of 30 patients with clinical and radiological diagnoses of OI were included in this work. All patients were selected from Hospital Estadual Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), Vitória-ES, Southeast Brazil, with approval by the Ethics Committee. The participants of this study were recruited from 2006 to 2012. All participants gave informed consent to participate in this study. Fifteen patients previously described by our group [Barbirato et al., 2009, 2015, 2016; Moraes et al., 2012] were re-analyzed in this research.



## 2.2 MUTATIONAL ANALYSIS

The Osteogenesis Imperfecta Variant Database contains a compilation of genetic variants from 17 OI-related genes [Dalglish, 1997, 1998]. In the present work, we selected the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* and *IFITM5* genes. Our choice was based in those genes being reported as the most prevalent with causative-OI mutations [Dalglish, 1997, 1998].

DNA samples were collected from peripheral blood and extracted using the Miller et al. [Miller et al., 1988] protocol. PCR of exons and exon/intron boundaries was done in genomic DNA followed by single strand conformation polymorphism (SSCP) screening and Sanger sequencing of abnormal fragments on polyacrylamide gel for the analysis of the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1* and *FKBP10* genes until 2013. As the NGS technology can detect genetic variations with higher sensitivity than SSCP screening, we re-analyzed patients for whom the molecular diagnosis was not conclusive in May 2015 through an NGS panel that contained the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10* and *SP7* genes. After July 2015, patients without conclusive molecular results were analyzed through direct Sanger sequencing for the *WNT1* and *IFITM5* genes.

For SSCP screening, all exons of analyzed genes and their flanking regions were screening by using 5-7% acrylamide gels and commercial version MDE<sup>®</sup> Mutation Detection Enhancement Gel (Lonza Group Ltd., USA) to improve sensitivity. Fragments with abnormal patterns on SSCP gels were analyzed after silver staining, and Sanger sequencing was performed in an ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Restriction enzyme PCR or allele-specific PCR was used to validate the mutations identified through SSCP screening.

For the NGS methodology, the exome sequence technique was performed with a NEXTERA kit (Illumina, USA), which was used to prepare the sample library and capture genes. A total of 10 ng DNA/sample was used for the target enrichment step. For quantification of the samples and to verify the length of the library, we used the High Sensitivity DNA kit in the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). qPCR was performed by KAPA Library Quantification Kit in the Real Time

LightCycler<sup>®</sup> System (Roche, DE). The captured libraries were sequenced with a Miseq Sequencer (Illumina, USA).

NGS sequence reads were aligned to the human reference genome (hg19, GRCh37) with the Burrows-Wheeler Aligner (BWA, version 0.6.1) [Li & Durbin, 2009]. To verify single-nucleotide variant (SNV) substitutions and small indels (INDELs), variants were called with SAM tools (version 0.1.18), Picard tools (version 1.60) and a Genome Analysis Toolkit (GATK, version 1.5.21) [Li et al., 2009; McKenna et al., 2010] that also settled the SNV list. Genotypes were called at all positions with high-quality sequence bases and filtered to retain SNVs and insertion-deletions with Phred-like quality scores of at least 20. Sanger sequencing validated the mutations identified by NGS methodology.

### 3. RESULTS

This study consisted of a total of 30 unrelated OI patients (16 males; 14 females), based on clinical and radiological diagnosis. Patients with severe phenotype were observed in 37% of the sample (11/30), moderate in 23% (7/30) and mild in 40% (12/30) of the total. Lethal OI cases were not included in this work. Isolated OI patients accounted for 67% (20/30) of the sample. Additionally, positive familial history was reported by 30% (9/30) of the patients. There were affected members in more than one generation according to the autosomal dominant pattern of inheritance in eight distinct families. We observed one family that only affected sibs was reported, suggesting an autosomal recessive pattern. The assessment of familial history was not available for patient P.11. Only one patient (P.2) reported consanguinity of their parents.

Disease-causing variants were identified in 97% (29/30) of the study patients. The initial SSCP screening and Sanger sequencing of abnormal fragments on polyacrylamide gel allowed the detection of mutations in 10 patients (seven mutations in the *COL1A1* gene, one change in the *COL1A2* gene, one genetic variants in the *P3H1* gene, and one mutation in the *FKBP10* gene).

In the following analysis, the NGS methodology was performed in 20 patients, including 18 patients for whom mutations were not identified and in two whom the result was not conclusive in the previous analysis. The NGS technique allowed the

identification of mutations in 17 patients (seven pathogenic changes in the *COL1A1* gene, eight mutations in the *COL1A2* gene, pathogenic variants in two patients in *FKBP10* gene). The NGS methodology also allowed the confirmation of likely pathogenic *P3H1* gene variant previously detected by SSCP in the patient P.26. Sanger sequencing for the *IFITM5* gene identified mutation in one the patient. The causative OI mutation was not detected in the patient P.30.

Overall, a total of 28 distinct mutations were identified, including 7 novel changes. Two variants were reported more than one time in distinct families. The remaining 26 genetic variants were unique. In total, 14 mutations were found in the *COL1A1* gene, nine in the *COL1A2* gene and one in the *IFITM5* gene. Four mutations were detected in the *FKBP10* gene. Two other unrelated patients carry mutations in the *P3H1* gene. No mutations were found in the *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINF1*, *SERPINH1*, *WNT1* or *SP7* genes in the studied sample. The main results are listed in Table 1.

Table 1. Genetic variations found in Osteogenesis Imperfecta patients.

Patient	Gene	Exon/Intron	Mutation (cDNA)	Mutation (Protein)	Mutation Type	Zygosity	OI phenotype	Familial	Novel
P.1	COL1A1	Exon 8	c.608G>T	p.Gly203Val	Missense	Heterozygous	severe	No	No
P.2	COL1A1	Exon 13	c.887G>T	p.Gly296Val	Missense	Heterozygous	mild	Yes	Yes
P.3	COL1A1	Intron 16	c.1056+1G>A	Splice Site	Splicing	Heterozygous	moderate	No	No
P.4	COL1A1	Exon 17	c.1138G>T	p.Gly380Cys	Missense	Heterozygous	mild	Yes	No
P.5	COL1A1	Exon 18	c.1165G>T	p.Gly389Cys	Missense	Heterozygous	moderate	No	No
P.6	COL1A1	Intron 27	c.1875+1G>C	Splice Site	Splicing	Heterozygous	severe	No	No
P.7	COL1A1	Exon 32	c.2165G>C	p.Gly722Ala	Missense	Heterozygous	mild	No	Yes
P.8	COL1A1	Exon 37	c.2523delT	p.(Gly842Alafs*266)	Frameshift	Heterozygous	mild	Yes	No
P.9	COL1A1	Intron 37	c.2559+1G>A	Splice Site	Splicing	Heterozygous	mild	Yes	No
P.10	COL1A1	Exon 40	c.2750delG	p.(Gly917Aspfs*191)	Frameshift	Heterozygous	severe	Yes	Yes
P.11	COL1A1	Exon 44	c.3162delT	p.(Gly1055Alafs*53)	Frameshift	Heterozygous	mild	N/A	No
P.12	COL1A1	Exon 45	c.3235G>A	p.Gly1079Ser	Missense	Heterozygous	mild	Yes	No
P.13	COL1A1	Exon 45	c.3235G>A	p.Gly1079Ser	Missense	Heterozygous	mild	Yes	No
P.14	COL1A1	Exon 45	c.3239delC	p.(Pro1080Leufs*28)	Frameshift	Heterozygous	severe	No	Yes
P.15	COL1A2	Intron 14	c.693+2T>C	Splice Site	Splicing	Heterozygous	moderate	No	No
P.16	COL1A2	Exon 16	c.739G>C	p.Gly247Arg	Missense	Heterozygous	moderate	No	No
P.17	COL1A2	Exon 34	c.2027G>A	p.Gly676Asp	Missense	Heterozygous	mild	No	No
P.18	COL1A2	Exon 38	c.2314G>A	p.Gly772Ser	Missense	Heterozygous	mild	No	No
P.19	COL1A2	Exon 38	c.2314G>A	p.Gly772Ser	Missense	Heterozygous	mild	Yes	No
P.20	COL1A2	Intron 40	c.2565+1G>A	Splice Site	Splicing	Heterozygous	moderate	No	No
P.21	COL1A2	Exon 40	c.2458G>A	p.Gly820Ser	Missense	Heterozygous	severe	No	No
P.22	COL1A2	Exon 49	c.3278G>A	p.Gly1093Asp	Missense	Heterozygous	severe	No	No
P.23	COL1A2	Exon 49	c.3296G>C	p.Gly1099Ala	Missense	Heterozygous	severe	No	Yes
P.24	IFITM5	5'UTR	c.-14C>T	p.Met1ext-5	Start Codon	Heterozygous	severe	No	No
P.25	P3H1	Intron 5	c.1080+1G>T	Splice Site	Splicing	Homozygous	severe	No	No
P.26	P3H1	Exon 14	c.2024G>T	p.Trp675Leu	Missense	Heterozygous	severe	Yes	No
P.27	FKBP10	Exon 1	c.21dupC	p.Ser8Glnfs*67	Frameshift	Homozygous	moderate	No	No
P.28	FKBP10	Exon 1	c.179A>C	p.Gln60Pro	Missense	Heterozygous	moderate	No	Yes
		Intron 6	c.1063+2T>C	Splice Site	Splicing	Heterozygous			Yes
P.29	FKBP10	Exon 5	c.831dupC	p.Gly278Argfs*95	Frameshift	Homozygous	severe	No	No
P.30	-	-	-	-	-	-	mild	No	-

N/A: Not available

#### 4. DISCUSSION

In our study, we analyzed 30 unrelated OI patients for the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* and *IFITM5* genes through SSCP screening, NGS techniques and Sanger sequencing. We identified pathogenic mutations in 97% of the sample, including 7 novel changes. Causative OI mutations were detected in 80% of genes related to autosomal dominant OI (*COL1A1*, *COL1A2* or *IFITM5* genes) and 17% of genes involved in autosomal recessive OI forms (*P3H1* or *FKBP10* genes). Because there are different genes related to OI and a lack of hotspots of mutations in most populations, the investigation of mutations becomes expensive and difficult.

In the present work, the study of the *COL1A1*, *COL1A2*, *P3H1*, *FKBP10* and *IFITM5* genes from among 17 other distinct genes that can cause OI allowed the detection of genetic changes in up to 95% of the sample, supporting the idea that these genes share most of the mutations among OI patients. We failed to identify any mutations in one patient. This likely occurred because this patient carries pathogenic changes in a gene that was not analyzed in this study or because the pathogenic variant was in a regulatory region that was not studied. When a causative OI mutation cannot be identified among the many genes studied, the other genes must be analyzed to define the molecular diagnosis.

Bardai, et al. [2016], in a study from Canada that enrolled 598 OI individuals, proposed the division of patients into groups according to their phenotype to improve the identification of causative-OI mutations. In our sample, when we divided the patients using this parameter, all patients with mild spectrum in which the mutation was identified showed mutation in the *COL1A1*/*COL1A2* genes. Bardai et al. [2016], also showed that 77% of patients with moderate/severe spectrum carry mutations in *COL1A1*/*COL1A2* genes, 9% of the patients share genetic changes in the *IFITM5* gene, and 12% of patients carry mutations in genes related to recessive OI pattern. The authors showed that the genes with a more prevalent number of mutations in their study among those with the recessive OI pattern are *SERPINF1*, *CRTAP*, *P3H1*, *WNT1* and *FKBP10*. In our study, we identified pathogenic changes only in the *P3H1* and *FKBP10* genes.

The majority of causative-OI mutations identified were in the *COL1A1* gene, representing 47% (14/30) of all variants detected in this study, followed by 30%

(9/30) in the *COL1A2* gene, 10% (3/30) in the *FKBP10* gene, 7% in the *P3H1* gene (2/30) and 3% (1/30) in the *IFITM5* gene. As reported in several works, one-half or more of OI patients carry changes in the *COL1A1* gene, followed by the *COL1A2* gene [Zhang et al., 2012; Lindahl et al., 2015; Ho et al., 2016]. Moreover, our data also confirmed that approximately 60% of *COL1A1/COL1A2* gene mutations were glycine substitutions, while 40% of patients carry other types of genetic variations, including mainly changes to splice sites and frameshift mutations.

Genes involved with recessive OI forms of inheritance that were previously reported by our group [Barbirato et al., 2015, 2016] were re-analyzed in this research. NGS technology confirmed what was predicted as a disease-causing c.2024G>T (p.Trp675Leu) missense change in the *P3H1* gene in the heterozygous state in patient P.26. In this patient, no other genetic change was found in any of the studied genes. The second pathogenic change in this patient may be localized in a non-coding region of the *P3H1* gene, which was not analyzed in this work. However, as we did not find a second change, we cannot exclude the fact that the causative-OI mutation can be in another *loci*.

The use of the NGS technique allowed the identification of two variants in patient P.28, the c.179A>C (p.Gln60Pro) missense change (exon 1) and the c.1063+2T>C splicing site alteration (intron 6) in the *FKBP10* gene. Another change identified in the same gene by NGS methodology was the c.21dupC homozygous mutation detected in patient P.27. All of these mutations in the *FKBP10* gene are predicted to be pathogenic changes.

The *FKBP10* c.831dupC frameshift change and the *P3H1* c.1080+1G>T mutation, previously identified by our group [Barbirato et al., 2015, 2016], are very well described in the literature [Fratzl-Zelman et al., 2016; Caparros-Martin et al., 2017]. Therefore, they were re-analyzed only by Sanger sequence methodology. These homozygous changes were confirmed in patients P.29 and P.25, respectively. The *P3H1* c.1080+1G>T change has a carrier frequency of approximately 1/240 in the African American population and usually results in a perinatal lethal form of OI [Cabral et al., 2007]. In some populations, the carrier frequency of this allele is relatively high. As the carrier frequency in a population increases, the proportion of infants with recessively inherited OI due to homozygosity for one allele increases, as demonstrated in homozygosity for *P3H1* c. 1080+1G>T among West Africans and the presence of founder mutations in other distinct geographic endogamous groups

[Pepin et al., 2013]. In our sample, this change was observed only once among 30 unrelated OI patients. The number of patients studied for this rare change in our work is small to infer their approximate proportion in our population.

The c.-14C>T change identified in one patient in our sample is a recurrent mutation in the *IFITM5* gene in the literature [Liu et al., 2016, Guan et al., 2017]. Bardai et al. (2016) found this mutation in 5% of the patients, a very similar proportion found in the patients from our sample.

The great number of techniques involving sequencing of whole genomes becomes a challenge when characterizing the clinical status of variants with uncertain significance (VUS). The characterization of different VUS among distinct groups can aid in the interpretation of the clinical spectrum of rare variants. In the present study, we re-analyzed through NGS and Sanger sequencing the status of seven genetic variants: i) the c.1812C>T (p.Pro604=) synonymous variant in the *P3H1* gene; ii) the c.1087A>G (p.Lys363Glu) missense change in the *P3H1* gene; iii) the c.558A>G (p.Ala186=) change in the *CRTAP* gene; the two following changes present in the *FKBP10* gene: iv) the c.590A>G (p.Lys197Arg) missense change; and v) c.1546G>A (p.Leu516Phe) variant; and the two following changes in the *SERPINF1* gene: vi) the c.18A>G (p.Leu6=) synonymous variation and vii) c.21C>A (p.Leu7=) change, previously reported by our group [Barbirato et al., 2015, 2016]. These variations are present in patients P.1, P.10, P.11, P.24 and P.27 who carry pathogenic known changes (table 1). The identification of these known pathogenic mutations in patients who carry these genetic variants suggests that these changes are rare non-pathogenic variants.

The presence of high consanguinity or a founder effect can change the prevalence of mutations among different populations, as described by Bardai et al. [2016], who found the majority of mutations to be in the *SERPINF1* and *CRTAP* genes among those who are related with a recessive pattern. Minilo et al. [2014] also found the same *SERPINF1* gene mutation in two unrelated Brazilian families, one of them with at least 4 generations of affected patients and reporting high consanguinity, supporting the hypothesis of a founder effect. In our study, mutations were identified neither in the *SERPINF1* or *CRTAP* nor in the *PPIB*, *SERPINH1*, *WNT1* or *SP7* genes, suggesting that mutations in these genes are rare in the studied sample.

The identification of mutated genes and the differentiation between dominant and recessive autosomal forms in patients can provide the basis for accurate counseling regarding prognosis and reproductive purposes allowing the prevention of new cases of the disease in the population. In this study, we analyzed 30 unrelated OI patients through mutations in the eleven most frequently mutated genes from the OI mutations database. Causative changes were found in almost 97% of the patients, including 47% in the *COL1A1* gene, 30% in the *COL1A2* gene, 10% in the *FKBP10* gene, 7% in the *P3H1* gene and 3% in the *IFITM5* gene. We detected no disease-causing variants in one patient. The molecular diagnosis of OI becomes extremely difficult due to the presence of 17 distinct relevant genes. Hence, the study of the most frequently mutated genes in OI patients can help improve molecular strategies of diagnosis for the disease. Our data show that the analysis of these five genes in OI Brazilian patients is able to detect up to 95% of causative mutations. We cannot forget that distinct populations can have different proportions of disease-causing variants. Therefore, the replication of this study in other groups is necessary for knowledge of the profile of OI mutations in distinct communities.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We value the assistance and technical support of the researchers at Núcleo de Genética Humana e Molecular – NGHM. We also thank the patients who participated in this research. This work was supported by CNPQ, MCTI, MEC/CAPES, FAPES/Decit/SCTIE/MS, FACITEC, and UFES.



## REFERENCE

Árvai K, Horváth P, Balla B, Tobiás B, Kató K, Kirschner G, Klujber V, Lakatos P and Kósa JP (2016). Next-generation sequencing of common osteogenesis imperfecta-related genes in clinical practice. *Sci Rep* 6: 28417.

Barbirato C, Almeida MG, Milanez M, Sipolatti V, Rebouças MRGO, Akel AN Jr, Nunes VR, Perrone AM, Zatz M, Louro ID and Paula F (2009). A novel COL1A1 gene-splicing mutation (c.1875+1G>C) in a Brazilian patient with osteogenesis imperfecta. *Genet Mol Res* 8: 173–178.

Barbirato C, Trancozo M, Almeida MG, Almeida LS, Santos TO, Duarte JCG, Rebouças MR, Sipolatti V, Nunes VR and Paula F (2015). Mutational characterization of the P3H1/CRTAP/CypB complex in recessive osteogenesis imperfecta. *Genet. Mol. Res* 14: 15848–15858.

Barbirato C, Trancozo M, Rebouças MR, Sipolatti V, Nunes VR and Paula F (2016). Analysis of FKBP10, SERPINH1, and SERPINF1 genes in patients with osteogenesis imperfecta. *Genet Mol Res*: 15.

Bardai G, Moffatt P, Glorieux FH and Rauch F (2016). DNA sequence analysis in 598 individuals with a clinical diagnosis of osteogenesis imperfecta: diagnostic yield and mutation spectrum. *Osteoporos Int* 27: 3607-3613.

Cabral WA, Chang W, Barnes AM, Weis M, Scott MA, Leikin S, Makareeva E, Kuznetsova NV, Rosenbaum KN, Tifft CJ, et al. (2007). Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat Genet* 39: 359–365.

Caparros-Martin JA, Aglan MS, Temtamy S, Otaify GA, Valencia M, Nevado J, Vallespin E, Pozo AD, Castro CP, Calatrava-Ferreras L, et al. (2017). Molecular spectrum and differential diagnosis in patients referred with sporadic or autosomal recessive osteogenesis Imperfecta. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 5(1): 28–39.

Cho TJ, Lee KE, Lee SK, Song SJ, Kim KJ, Jeon D, Lee G, Kim HN, Lee HR, Eom HH, et al. (2012). A Single Recurrent Mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* Causes Osteogenesis Imperfecta Type V. *American Journal of Human Genetics* 91(2): 343–348.

Dalgleish R (1997). The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Res* 25: 181–187.

Dalgleish R (1998). The Human Collagen Mutation Database. *Nucleic Acids Res* 26: 253–255.

Folkestad L, Hald JD, Canudas-Romo V, Gram J, Hermann AP, Langdahl B, Abrahamsen B and Brixen K (2016) Mortality and Causes of Death in Patients With Osteogenesis Imperfecta: A Register-Based Nationwide Cohort Study. *J Bone Miner Res* 31: 2159–2166.

Fratzl-Zelman N, Barnes AM, Weis MA, Carter E, Hefferan TE, Perino G, Chang W, Smith PA, Roschger P, Klaushofer K, et al. (2016). Non-Lethal Type VIII

Osteogenesis Imperfecta Has Elevated Bone Matrix Mineralization. *J Clin Endocrinol Metab* 101(9): 3516–3525.

Guan S, Bai X, Wang Y, Liu Z, Ren X, Zhang T, Ju M, Li K, Li G (2017). Genetic mutation and clinical features of osteogenesis imperfecta type V. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 34(6): 797-801.

Hanagata N (2016). IFITM5 mutations and osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Metab* 34(2): 123-131.

Ho Duy B, Zhytnik L, Maasalu K, Kändla I, Prans E, Reimann E, Märtson A and Köks S (2016). Mutation analysis of the COL1A1 and COL1A2 genes in Vietnamese patients with osteogenesis imperfecta. *Hum. Genomics* 10: 27.

Kang H, Aryal ACS and Marini JC (2017). Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. *Translational Research* 181: 27-48.

Li H and Durbin R (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform, *Bioinformatics* 25: 1754–1760.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078–2079.

Lindahl K, Åström E, Rubin CJ, Grigelioniene G, Malmgren B, Ljunggren Ö and Kindmark A (2015). Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* 23: 1042–1050.

Liu Y, Wang J, Ma D, Lv F, Xu X, Xia W, Jiang Y, Wang O, Xing X, Zhou P, et al. (2016). Osteogenesis imperfecta type V: Genetic and clinical findings in eleven Chinese patients. *Clin Chim Acta* 462: 201-209.

Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe A, Fassier F, Fratzl-Zelman N, Kozloff Km, Krakow D, et al. (2017). Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers* 3: 17052.

McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M and DePristo MA (2010). The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20: 1297–1303.

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

Minillo RM, Sobreira N, de Faria Soares M, Jurgens J, Ling H, Hetrick KN, Doheny KF, Valle D, Brunoni D and Perez AB (2014). Novel deletion of SERPINF1 causes autosomal recessive osteogenesis imperfecta type VI in two Brazilian families. *Mol Syndromol* 5: 268–275.

Moraes MV, Milanez M, Almada BV, Sipolatti V, Rebouças MR, Nunes VR, Akel AN Jr, Zatz M, Errera FI, Louro ID and Paula F (2012). Variable expressivity of osteogenesis imperfecta in a brazilian family due to P.G1079S mutation in the COL1A1 gene. *Genet Mol Res* 11: 3246–3255.

Pepin MG, Schwarze U, Singh V, Romana M, Jones-LeCointe A and Byers PH (2013). Allelic background of *LEPRE1* mutations that cause recessive forms of osteogenesis imperfecta in different populations. *Mol Genet Genomic Med* 1: 194–205.

Semler O, Garbes L, Keupp K, Swan D, Zimmermann K, Becker J, Iden S, Wirth B, Eysel P, Koerber F, et al. (2012). A Mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. *The American Journal of Human Genetics* 91: 349–357.

Sillence DO, Senn A and Danks DM (1979). Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J. Med. Genet* 16: 101–116.

Sule G, Campeau PM, Zhang VW, Nagamani SCS, Dawson BC, Grover M, Bacino CA, Sutton VR, Brunetti-Pierri N, Lu JT, Lemire E, Gibbs RA, Cohn DH, Cui H, Wong LJ and Lee BH (2013). Next-generation sequencing for disorders of low and high bone mineral density. *Osteoporos Int* 24: 2253–2259.

van Dijk FS, Byers PH, Dalgleish R, Malfait F, Maugeri AM, Rohrbach M, Symoens S, Sistermans EA and Pals G (2012). EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* 20: 11–9.

van Dijk FS, Pals G, van Rijn RR, Nikkels PGJ and Cobben JM (2010). Classification of Osteogenesis Imperfecta revisited. *Eur J Med Genet* 53: 1-5.

Zhang ZL, Zhang H, Ke YH, Yue H, Xiao WJ, Yu JB, Gu JM, Hu WW, Wang C, He JW and Fu WZ (2012). The identification of novel mutations in *COL1A1*, *COL1A2*, and *LEPRE1* genes in Chinese patients with osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Metab* 30: 69–77.

## 6 – CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

A amostra total desta dissertação conta com 35 indivíduos. Contudo, apenas 31 deles tinha resultados de análise dos genes *COL1A1*, *COL1A2*, *LEPRE 1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7* e *WNT1*, envolvidos com a OI. Os outros quatro pacientes foram estudados apenas para o gene *IFITM5*, portanto eles não foram incluídos na amostra do artigo apresentado nos resultados desta dissertação.

Nos estudos realizados previamente, a técnica de NGS identificou duas alterações presentes no mesmo paciente (P31): uma no gene *COL1A1* e outra no gene *COL1A2*. O Sequenciamento de Sanger validou apenas a mutação encontrada no gene *COL1A1*. A sequência do gene *COL1A2* que continha mutação apontada pelo sequenciamento do NGS não apresentou alteração pelo Sequenciamento de Sanger, portanto esta mutação não foi validada. Como não foi possível coletar nova amostra de indivíduos desta família, para confirmar os resultados de validação, este paciente foi retirado da amostra apresentada no artigo submetido.

## 7 – CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo do gene *IFITM5* associado à OI na população do Espírito Santo. A mutação c.-14C>T, recorrente em várias populações do mundo, foi identificada em 3% da amostra deste trabalho. Além disto, verificou-se que apenas uma alteração das 17 sequências analisadas, não foi validada por sequenciamento de Sanger para os genes *COL1A1* e *COL1A2*, sugerindo que a metodologia de NGS apresenta uma boa relação custo-benefício, porém seus resultados precisam ser validados.

A detecção de mutações patogênicas e a posterior confirmação, através de técnicas diferenciadas, dessas mutações, contribuem para o aumento de informações a respeito de uma doença, incentivando a compreensão dos seus aspectos clínicos e genéticos. Isto pode auxiliar no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico molecular mais eficientes, o que permite a realização de aconselhamento genético mais fidedigno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANAY Y, AVAYGAN H, CAMACHO N, UTINE G E, BODUROGLU K, AKTAS D, ALIKASIFOGLU M, TUNCBILEK E, ORHAN D, BAKAR F T, ZABEL B, SUPERTIFURGA A, BRUCKNER-TUDERMAN L, CURRY C J, PYOTT S, BYERS P H, EYRE D R, BALDRIDGE D, LEE B, MERRILL A E, DAVIS E C, COHN D H, AKARSU N, KRAKOW D. Mutations in the Gene Encoding the RER Protein FKBP65 Cause Autosomal-Recessive Osteogenesis Imperfecta. **The American Journal of Human Genetics**, v.86(4), p.551-559, 2010.

AL-JALLAD H, PALOMO T, MOFFATT P, ROUGHLEY P, GLORIEUX F H, RAUCH F. Normal bone density and fat mass in heterozygous SERPINF1 mutation carriers. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 99, p. E2446–1450. 2014.

ALMEIDA M G. **Mutações na região aminoterminal do gene COL1A2 e a manifestação da Osteogênese Imperfeita**. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 2011.

AMOR M B, GLORIEUX F H, RAUCH F. Genotype-Phenotype Correlations in Autosomal Dominant Osteogenesis Imperfecta. **Journal of Osteoporosis**, v.2011. Article ID 540178, 9 páginas, 2011.

BALDRIDGE D, SCHWARZE U, MORELLO R, LENNINGTON J, BERTIN T K, PACE J M, PEPIN M G, WEIS M, EYRE D R, WALSH J, LAMBERT D, GREEN A, ROBINSON H, MICHELSON M, HOUGE G, LINDMAN C, MARTIN J, WARD J, LEMYRE E, MITCHELL J J, KRAKOW D, RIMOIN D L, COHN D H, BYERS P H, LEE B. CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. **Hum Mutat**. v. 29 (12), p.1435–1442. 2008.

BALJET B. Aspects of the history of Osteogenesis Imperfeita (Vrolik's syndrome). **Ann Anat**. v. 184. p. 1-7. 2002.

BARDAI G, WARD L M, TREJO P, MOFFATT P, GLORIEUX F H, RAUCH F. Molecular diagnosis in children with fractures but no extraskelatal signs of osteogenesis imperfect. **Osteoporos Int**. v. 28(7), p. 2095-2101. 2017.

BARDAI G, MOFFATT P, GLORIEUX F H, RAUCH F. DNA sequence analysis in 598 individuals with a clinical diagnosis of osteogenesis imperfecta: diagnostic yield and mutation spectrum. **Osteoporos Int**. v. 27(12), p. 3607-3613. 2016. 2016.

BASEL D, STEINER R D. Osteogenesis imperfecta: Recent findings shed new light on this once well-understood condition. **Genetics in Medicine**, v. 11, p. 375–385. 2009.

BASSAM B J, CAETANO-ANOLLÉS G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal Biochem.** v. 196(1), p.80-83. 1991.

BLOUIN S, FRATZL-ZELMAN N, GLORIEUX F H, ROSCHGER P, KLAUSHOFER K, MARINI J C, RAUCH F. Hypermineralization and High Osteocyte Lacunar Density in Osteogenesis Imperfecta Type V Bone Indicate Exuberant Primary Bone Formation. **J Bone Miner Res.** v. 32, p. 1884–1892. 2017.

BONAFE L, CORMIER-DAIRE V, HALL C, LACHMAN R, MORTIER G, MUNDLOS S, NISHIMURA G, SANGIORGI L, SAVARIRAYAN R, SILLENCE D, SPRANGER J, SUPERTI-FURGA A, WARMAN M, UNGER S. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. **Am J Med Genet Part A.** v. 167A, p. 2869–2892. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Portaria no 2305/2001**, de 19 de dezembro de 2001. Aprova o Protocolo de Indicação de Tratamento Clínico da osteogenesis imperfecta com pamidronato dissódico no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS. Diário Oficial da União. 20 dez 2001.

BRATANIC N, DZODAN B, TREBUSAK PODKRAJSEK K, BERTOK S, OSTANEK B, MARC J, BATTELINO T, AVBELJ STEFANIJA M. Childhood Osteoporosis and Presentation of Two Cases with Osteogenesis Imperfecta Type V. **Zdr Varst.** v. 54(2), p.119-125. 2015.

BYERS P H, COLE W G. Osteogenesis Imperfecta. In ROYCE P M, STEINMANN B. **Connective Tissue and Its Heritable Disorders: molecular, genetic, and medical aspects.** Cap. 8, p. 385–430. 2002.

BYERS P H, TSIPOURAS P, BONADIO J F, STARMAN B J, SCHWARTZ R C. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta (OI type II): a biochemically heterogeneous disorder usually due to new mutations in the genes for type I collagen. **American Journal of Human Genetics**, v. 42(2), p. 237-248. Fev. 1988.

CAMPOPIANO R, RYSKALIN L, GIARDINA E, ZAMPATTI S, BUSCETI C L, BIAGIONI F, FERESE R, STORTO M, GAMBARDELLA S, FORNAI F. Next Generation Sequencing and ALS: known genes, different phenotypes. **Arch Ital Biol.** v. 155(4), p.110-117. 2017.

CHO T J, LEE K E, LEE S K, SONG S J, KIM K J, JEON D, LEE G, KIM H N, LEE H R, EOM H H, LEE Z H, KIM O H, PARK W Y, PARK S S, IKEGAW S, YOO W J, KIM J W. A Single Recurrent Mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* Causes Osteogenesis Imperfecta Type V. **American Journal of Human Genetics**, v. 91(2), p. 343–348. 2012.

CHRISTIANSEN H E, SCHWARZE U, PYOTT S M, ALSWAID A, AL BALWI M, ALRASHEED S, PEPIN M G, WEIS M A, EYRE D R, BYERS PH. Homozygosity for a Missense Mutation in *SERPINH1*, which Encodes the Collagen Chaperone

Protein HSP47, Results in Severe Recessive Osteogenesis Imperfecta. **The American Journal of Human Genetics**. v. 86 (3). p.389–398. 2010.

CHU M-L, WET W, BERNARD M, RAMIREZ F. Fine Structural Analysis of the Human Pro- $\alpha$ 1(I) Collagen Gene: promoter structure, Alu repeats, and polymorphic transcripts. **The Journal Of Biological Chemistry**. v.260(4), p. 2315-2320. 1985.

CORRADI M, MONTI E, VENTURI G, GANDINI A, MOTTESS M, ANTONIAZZI F. The recurrent causal mutation for osteogenesis imperfecta type V occurs at a highly methylated CpG dinucleotide within the *IFITM5* gene. **J Pediatr Genet**. v. 3(1), p.35-39. 2014.

CRAWFORD S E, FITCHEV P, VELICEASA D, VOLPERT O V. The many facets of PEDF in drug discovery and disease: a diamond in the rough or split personality disorder? **Expert Opinion on Drug Discovery**. v. 8(7), p.769-792. 2013.

CUNDY T. Recent advances in osteogenesis imperfecta. **Calcified Tissue International**. v. 90, p. 439–449. 2012.

DALGLEISH R. The Human Type I Collagen Mutation Database. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 1, p. 253-255, 1998.

DALGLEISH R. The Human Type I Collagen Mutation Database. **Nucleic Acids Research**. v. 25, p. 181–187. 1997.

ENGEL J, PROCKOP D J. The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**. v. 20, p.137–152. 1991.

FAHIMINIYA S, MAJEWSKI J, MORT J, MOFFATT P, GLORIEUX F H, RAUCH F. Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. **J Med Genet**. v. 50(5), p. 345–348. 2013.

FARBER C R, REICH A, BARNES A M, BECERRA P., RAUCH F, CABRAL W A, BAE A, QUINLAN A, GLORIEUX F H, CLEMENS T L, MARINI J C. 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**. v. 29(6), p. 1402–1411. 2014.

FORLINO A, CABRAL W A, BARNES A M, MARINI J C. New perspectives on osteogenesis imperfecta. **Nature Reviews Endocrinology**. v.7, p. 540-557. 2011.

FORLINO A, MARINI J C. Osteogenesis imperfecta. **Lancet**. v. 387, p. 1657–1671. 2016.

FRATZL-ZELMAN N, MORELLO R, LEE B, RAUCH F, GLORIEUX F H, MISOF B M, KLAUSHOFER K, ROSCHGER P. CRTAP deficiency leads to abnormally high



bone matrix mineralization in a murine model and in children with Osteogenesis Imperfecta type VII. **Bone**. v. 46(3), p. 820–826. 2010.

GLORIEUX F H, RAUCH F, PLOTKIN H, WARD L, TRAVERS R, ROUGHLEY P, LALIC L, GLORIEUX D F, FASSIER F O, BISHOP N J. Type V Osteogenesis Imperfecta: A New Form of Brittle Bone Disease. **Journal Of Bone And Mineral Research**. v. 15 (9), p. 1650-1659. 2000.

GLORIEUX F H, WARD L M, RAUCH F, LALIC L, ROUGHLEY PJ, TRAVERS R. Osteogenesis imperfecta type VI: a form of brittle bone disease with a mineralization defect. **J Bone Miner Res**. v. 17, p.30-38. 2014.

GRAY P H K. A case of Osteogenesis Imperfecta, associated with dentinogenesis imperfecta, dating from antiquity. **Clin. Radiol**. v. 20, p. 106-108. 1969.

GUAN S, BAI X, WANG Y, LIU Z, REN X, ZHANG T, JU M, LI K, LI G. Genetic mutation and clinical features of osteogenesis imperfecta type V. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**. v. 34(6), p. 797-801. 2017.

GUILLÉN-NAVARRO E, BALLESTA-MARTÍNEZ M J, VALENCIA M, BUENO A M, MARTINEZ-GLEZ V, LÓPEZ-GONZÁLEZ V, BURNYTE B, UTKUS A, LAPUNZINA P, RUIZ-PEREZ V L. Two mutations in *IFITM5* causing distinct forms of osteogenesis imperfect. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 164(5), p. 1136-1142. 2014.

HANAGATA N, LI X, MORITA H, TAKEMURA T, LI J, MINOWA T. Characterization of the osteoblast-specific transmembrane protein *IFITM5* and analysis of *IFITM5*-deficient mice. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**. v. 29, p. 279-290. 2011.

HANAGATA N, TAKEMURA T, MONKAWA A, IKOMA T, TANAKA J. Phenotype and gene expression pattern of osteoblast-like cells cultured on polystyrene and hydroxyapatite with preadsorbed type-I collagen. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. v. 83, p. 362-371. 2007.

HANAGATA N. *IFITM5* mutations and osteogenesis imperfecta. **J Bone Miner Metab**. v. 34(2), p. 123-131. 2016.

HA-VINH R, ALANAY Y, BANK R A, CAMPOS-XAVIER A B, ZANKL A, SUPERTIFURGA A, BONAFÉ L. Phenotypic and molecular characterization of Bruck syndrome (osteogenesis imperfect with contractures of the large joints) caused by a recessive mutation in *PLOD2*. **Am J Med Genet A**; v. 131, p. 115–20. 2004.

HOYER-KUHN H, SEMLER O, GARBES L, ZIMMERMANN K, BECKER J, WOLLNIK B, SCHOENAU E, NETZER C. A Nonclassical *IFITM5* Mutation Located in the Coding Region Causes Severe Osteogenesis Imperfecta With Prenatal Onset. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 29(6), p. 1387-1391. 2014.

HUBER, M. A. Osteogenesis imperfecta. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Edodontics**. v. 103, n. 3, p. 14-20. 2007.

INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J I. **PCR Strategies**. Academic press. 1995.

ISHIKAWA Y, VRANKA J A, BOUDKO S P, POKIDYSHEVA E, MIZUNO K, ZIENTEK K, KEENE D R, RASHMIR-RAVEN A M, NAGATA K, WINAND N J, BÄCHINGER H P. Mutation in cyclophilin B that causes hyperelastosis cutis in American Quarter Horse does not affect peptidylprolyl cis-trans isomerase activity but shows altered cyclophilin B-protein interactions and affects collagen folding. **J Biol Chem**. v. 287(26), p.22253–22265. 2012.

ISHIKAWA Y, WIRZ J, VRANKA J A, NAGATA K, BÄCHINGER H P. Biochemical characterization of the prolyl 3-hydroxylase 1. Cartilage-associated protein.cyclophilin B complex. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 284, p.17641–17647. 2009.

JUNIEN C, HUERRE C, RETHORE M O. Regional assignment of the alpha-2(I) collagen gene to band 7q21 by direct gene dosage determination. (Abstract) **Cytogenet. Cell Genet**. v.37, p. 502. 1984.

JUNIEN C, WEIL D, MYERS J C, VAN CONG N, CHU M-L, FOUBERT C, GROSS M-S, PROCKOP, D J, KAPLAN J-C, RAMIREZ F. Assignment of the human pro-alpha-2(I) collagen structural gene (COLIA2) to chromosome 7 by molecular hybridization. **American Journal of Human Genetics**. v.34, p. 381-387, 1982.

KANG H, ARYAL A C S, MARINI J C. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. **Translational Research**. v. 181, p. 27-48. 2017.

KEUPP K, BELEGGIA F, KAYSERILI H, BARNES A M, STEINER M, SEMLER O, FISCHER B, YIGIT G, JANDA C Y, BECKER J, BREER S, ALTUNOGLU U, GRÜNHAGEN J, KRAWITZ P, HECHT J, SCHINKE T, MAKAREEVA E, LAUSCH E, CANKAYA T, CAPARRÓS-MARTÍN J A, LAPUNZINA P, TEMTAMY S, AGLAN M, ZABEL B, EYSEL P, KOERBER F, LEIKIN S, GARCIA K C, NETZER C, SCHÖNAU E, RUIZ-PEREZ V L, MUNDLOS S, AMLING M, KORNAK U, MARINI J, WOLLNIK B. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. **Am J Hum Genet**. v. 92(4), p.565–574. 2013.

KIM C A, GONZALEZ C. Osteogenese imperfeita: revisao. **Pediatria (São Paulo)**. v. 15(1): p. 8-21. 1993.

KUIVANIEMI H, TROMP G, PROCKOP D J. Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. **The FASEB Journal**. v. 5(7), p. 2052-2060. 1991.

LAINÉ C M, JOENG K S, CAMPEAU P M, KIVIRANTA R, TARKKONEN K, GROVER M, LU J T, PEKKINEN M, WESSMAN M, HEINO T J, NIEMINEN-

PIHALA V, ARONEN M, LAINE T, KRÖGER H, COLE W G, LEHESJOKI A E, NEVAREZ L, KRAKOW D, CURRY C J, COHN D H, GIBBS R A, LEE B H, MÄKITIE O. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. **N Engl J Med**. v. 368(19), p.1809–1816. 2013.

LAPUNZINA P, AGLAN M, TEMTAMY S, CAPARRÓS-MARTÍN J A, VALENCIA M, LETÓN R, MARTÍNEZ-GLEZ V, ELHOSSINI R, AMR K, VILABOA N, RUIZ-PEREZ V L. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. **American Journal of Human Genetics**, v.87, p.110-114, 2010.

LAZARUS S, MCINERNEY-LEO A M, MCKENZIE F A, BAYNAM G, BROLEY S, CAVAN B V, MUNNS C F, PRUIJS J E, SILLENCE D, TERHAL P A, PRYCE K, BROWN M A, ZANKL A, THOMAS G, DUNCAN EL. The *IFITM5* mutation c.-14C > T results in an elongated transcript expressed in human bone; and causes varying phenotypic severity of osteogenesis imperfecta type V. **BMC Musculoskelet Disord**. v. 15, p.107. 2014.

LINDERT U, CABRAL W A, AUSAVARAT S, TONGKOBPETCH S, LUDIN K, BARNES A M, YEETONG P, WEIS M, KRABICHLER B, SRICHOMTHONG C, MAKAREEVA E N, JANECKE A R, LEIKIN S, RÖTHLISBERGER B, ROHRBACH M, KENNERKNECHT I, EYRE D R, SUPHAPEETIPORN K, GIUNTA C, MARINI J C, SHOTELERSUK V. MBTPS2 mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta. **Nat Commun**. v.7, p. 11920. 2016.

LIU Y, WANG J, MA D, LV F, XU X, XIA W, JIANG Y, WANG O, XING X, ZHOU P, WANG J, YU W; ASAN, LI M. Osteogenesis imperfecta type V: Genetic and clinical findings in eleven Chinese patients. **Clin Chim Acta**. v. 462, p.201-209. 2016.

LOOSER E. Zur Kenntnis der Osteogenesis Imperfecta Congenita et Tarda (sogenannte idiopathische Osteopsatyrosis) [in German]. **Mittlg Grenzgebiete Med Chir** v. 15, p. 161–207. 1906.

LUND A M, SKOVBY F, SCHWARTZ M. (G586V) substitutions in the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 chains of collagen I: Effect of  $\alpha$ -chain stoichiometry on the phenotype of osteogenesis imperfecta? **Human Mutation**, v. 9, n. 5, p. 431–436. 1997.

MAASALU K, NIKOPENSIUS T, KÖKS S, NÕUKAS M, KALS M, PRANS E, ZHYTNIK L, METSPALU A, MÄRTSON A. Whole-exome sequencing identifies de novo mutation in the *COL1A1* gene to underlie the severe osteogenesis imperfecta. **Human Genomics**. v.9 (6). 2015.

MAKITIE R E, HAANPAA M, VALTA H, PEKKINEN M, LAINE C M, LEHESJOKI A E, SCHALIN-JÄNTTI C, MÄKITIE O. Skeletal characteristics of WNT1 osteoporosis in children and young adults. **J Bone Miner Res**. v. 31(9), p.1734–1742. 2016.

MARINI J C, BLISSETT A R. New genes in bone development: what's new in osteogenesis imperfecta. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 98, p. 3095–3103. 2013.

MARINI J C, FORLINO A, CABRAL W A; 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. **Hum Mutat**. v. 28, p. 209–21. 2007.

MARINI J C, REICH A, SMITH S M. Osteogenesis Imperfecta due to Mutations in Non-Collagenous Genes-Lessons in the Biology of Bone Formation. **Current Opinion in Pediatrics**. v.26(4), p. 500–507. 2014.

MARINI J C. Osteogenesis imperfecta: comprehensive management. **Adv Pediatr**. v. 35, p.391. 1988.

MARINI J C, FORLINO A, BÄCHINGER H P, BISHOP N J, BYERS P H, PAEPE A, FASSIER F, FRATZL-ZELMAN N, KOZLOFF KM, KRAKOW D, MONTPETIT K, SEMLER O. Osteogenesis imperfecta. **Nat Rev Dis Primers**. v. 3, 17052, 19 págs. 2017.

MELO P C. **Osteogénese Imperfeita – “Ossos de Cristal” Revisão Bibliográfica**. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade da Beira Interior. Covilhã, Portugal, p. 2. 2015.

MENDOZA-LONDONO R, FAHIMINIYA S, MAJEWSKI J, TÉTREAULT M, NADAF J, KANNU P, SOCHETT E, HOWARD A, STIMEC J, DUPUIS L, ROSCHGER P, KLAUSHOFER K, PALOMO T, OUELLET J, AL-JALLAD H, MORT J S, MOFFATT P, BOUDKO S, BÄCHINGER H P, RAUCH F. Recessive osteogenesis imperfecta caused by missense mutations in SPARC. **Am J Hum Genet**. v. 96(6), p.979–985. 2015.

MICHELL C, PATEL V, AMIRFEYZ R, GARGAN M. Osteogenesis imperfecta. **Current Orthopaedics**. v. 21, n. 3, p. 236-241. 2007.

MILLER S A, DYKES D D, POLESKY H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**. v. 16(3), p. 1215. 1988.

MOFFATT P, GAUMOND M H, SALOIS P, SELLIN K, BESSETTE M C, GODIN E, OLIVEIRA P T, ATKINS G J, NANJI A, THOMAS G. Bril: a novel bone specific modulator of mineralization. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 23, p. 1497-1508. 2008.

MORAES, M. V. D. **Triagem de Mutações no Gene COL1A1 em Pacientes com Osteogenesis Imperfecta**. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia).

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, 2011.

MOUL A, ALLADIN A, NAVARRETE C, ABDENOUR G, RODRIGUEZ M M. Osteogenesis imperfecta due to compound heterozygosity for the LEPRE1 gene. **Fetal Pediatr Pathol.** v. 32(5), p.319–325. 2013.

MURAKAMI T, HINO S, NISHIMURA R, YONEDA T, WANAKA A, IMAIZUMI K. Distinct mechanisms are responsible for osteopenia and growth retardation in OASIS-deficient mice. **Bone.** v. 48(3), p. 514–523. 2011.

MURAKAMI T, SAITO A, HINO S, KONDO S, KANEMOTO S, CHIHARA K, SEKIYA H, TSUMAGARI K, OCHIAI K, YOSHINAGA K, SAITOH M, NISHIMURA R, YONEDA T, KOU I, FURUICHI T, IKEGAWA S, IKAWA M, OKABE M, WANAKA A, IMAIZUMI K. Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. **Nat Cell Biol.** v. 11(10), p.1205–1211. 2009.

MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO K I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. **Trends in Genetics.** v.20(1), p.33-43. 2004.

NUSSBAUM R L, McINNES R R, WILLARD H F. **Thompson & Thompson – Genética Médica.** 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier Medicina Brasil, 2008.

PATTERSON C E, SCHAUB T, COLEMAN E J, DAVIS E C. Developmental regulation of FKBP65: an ER localized extracellular matrix-binding protein. **Molecular Biology of the Cell,** v.11(11), p.3925-3935, 2000.

PEPIN M G, SCHWARZE U, SINGH V, ROMANA M, JONES-LECOINTE A, BYERS P H. Allelic background of LEPRE1 mutations that cause recessive forms of osteogenesis imperfecta in different populations. **Mol Genet Genomic Med.** v. 1(4), p.194–205. 2013.

PROCKOP D J, CONSTANTINOS D, DOMBROWSKI K E, HOJIMA Y, KADLER K E, et al. Type I procollagen: the gene-protein system that harbors most of the mutations causing osteogenesis imperfecta and probably more common heritable disorders of connective tissue. **American Journal of Medical Genetics.** v. 34, p.60–67. 1989.

PYOTT S M, SCHWARZE U, CHRISTIANSEN H E, PEPIN M G, LEISTRITZ D F, DINEEN R, HARRIS C, BURTON B K, ANGLE B, KIM K, SUSSMAN M D, WEIS M, EYRE D R, RUSSELL D W, MCCARTHY K J, STEINER R D, BYERS P H. Mutations in PPIB (cyclophilin B) delay type I procollagen chain association and result in perinatal lethal to moderate osteogenesis imperfect phenotypes. **Hum Mol Genet.**v. 20(8), p. 1595–1609. 2011.

PYOTT S M, TRAN T T, LEISTRITZ D F, PEPIN M G, MENDELSON N J, TEMME R T, FERNANDEZ B A, ELSAYED S M, ELSOBKY E, VERMA I, NAIR S, TURNER E H, SMITH J D, JARVIK G P, BYERS P H. WNT1 Mutations in Families Affected by

Moderately Severe and Progressive Recessive Osteogenesis Imperfecta. **The American Journal of Human Genetics**. v. 92(4), p.590–597, 2013.

RAMOS A D R. **CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias**. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Coimbra, p. 28. 2016.

RAUCH F, GLOURIEUX F H. Osteogenesis imperfect. **The Lancet** . v. 363 (9418), p. 1377 – 1385. 2004.

RAUCH F, HUSSEINI A, ROUGHLEY P, GLORIEUX FH, MOFFATT P. Lack of circulating pigment epithelium-derived factor is a marker of osteogenesis imperfecta type VI. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 97, p. E1550–1556. 2012.

RAUCH F, MOFFATT P, CHEUNG M, ROUGHLEY P, LALIC L, LUND A M, RAMIREZ N, FAHIMINIYA S, MAJEWSKI J, GLORIEUX F H. Osteogenesis imperfecta type V: marked phenotypic variability despite the presence of the *IFITM5* c.-14C>T mutation in all patients. **Journal of Medical Genetics**. v. 59, p. 21-24. 2013.

REICH A, BAE A S, BARNES A M, CABRAL W A, HINEK A, STIMEC J, HILL S C, CHITAYAT D, MARINI J C. Type V OI primary osteoblasts display increased mineralization despite decreased *COL1A1* expression. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 100(2), p. 325–332. 2015.

RETIEF E, PARKER M I, RETIEF A E. Regional chromosome mapping of human collagen genes alpha 2(I) and alpha 1(I) (*COLIA2* and *COLIA1*). **Hum. Genet**. v.69, p. 304-308, 1985.

RICARD-BLUM S. The Collagen Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v.3(1):a004978. 2011

ROSSET E M, BRADSHAW A D. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. **Matrix Biol**. v. 52-54, p.78–87. 2016.

ROUGHLEY P J, RAUCH F, GLORIEUX F H. Osteogenesis imperfecta - clinical and molecular diversity. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 41-47. 2003.

SAM J E, DHARMALINGAM M. Osteogenesis imperfecta. **Indian J Endocr Metab**. v. 21, p. 903-908. 2017.

SANGUINETTI C J, DIAS NETO E, SIMPSON A J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**. v. 17(5), p.914-921. 1994.

SEMLER O, GARBES L, KEUPP K, SWAN D, ZIMMERMANN K, BECKER J, IDEN S, WIRTH B, EYSEL P, KOERBER F, SCHOENAU E, BOHLANDER S K, WOLLNIK

B, AND NETZER C. A Mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. **The American Journal of Human Genetics**. v. 91, p. 349–357. 2012.

SHAHEEN R, ALAZAMI A M, ALSHAMMARI M J, FAQEIH E, ALHASHMI N, MOUSA N, ALSINANI A, ANSARI S, ALZHRANI F, AL-OWAIN M, ALZAYED Z S, ALKURAYA F S. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by *TMEM38B* mutation. **J Med Genet**. v. 49, p.630–635. 2012.

SILLENCE D O, SENN A, DANKS D M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. **Journal of Medical Genetics**, v. 16, p. 101-116, 1979.

SOLOMON E, HIORNS L, DALGLEISH R, TOLSTOSHEV P, CRYSTAL R, SYKES B. Regional localization of the human alpha-2(I) collagen gene on chromosome 7 by molecular hybridization. **Cytogenet. Cell Genet**. v.35, p. 64-66, 1983.

SOUZA A S R, CARDOSO A S, LIMA M M S, GUERRA G V Q L. Diagnóstico pré-natal e parto transpélvico na osteogênese imperfeita: relato de caso. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet** v. 28, n. 4, p. 244-250. 2006.

STEINER R D, ADSIT J, BASEL D. *COL1A1/2*-Related Osteogenesis Imperfecta. **GeneReviews®**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Jan 2005.

TAKAGI M, ISHII T, BARNES A M, WEIS M, AMANO N, TANAKA M, FUKUZAWA R, NISHIMURA G, EYRE D R, MARINI J C, HASEGAWA T. A novel mutation in *LEPRE1* that eliminates only the KDEL ER- retrieval sequence causes non-lethal osteogenesis imperfecta. **PLoS One**. v. 7(5), p. e36809. 2012.

TENG S W, GUO W Y, SHEU M H, WANG P H. Initial experience using magnetic resonance imaging in prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta type II: a case report. **Clin Imaging**. v. 27(1), p.55-58. 2003.

TREJO P, RAUCH F. Osteogenesis imperfecta in children and adolescents-new developments in diagnosis and treatment. **Osteoporosis International**. v. 27(12), p. 3427-3437. 2016.

VALLI M, BARNES A M, GALLANTI A, CABRAL W A, VIGLIO S, WEIS M A, MAKAREEVA E, EYRE D, LEIKIN S, ANTONIAZZI F, MARINI J C, MOTTESS M. Deficiency of *CRTAP* in non-lethal recessive Osteogenesis Imperfecta reduces collagen deposition into matrix. **Clin Genet**. v. 82(5), p. 453–459. 2012.

VAN DER SLOT A J, ZUURMOND A M, BARDOEL A F, WIJMENGA C, PRUIJS H E, SILLENCE D O, BRINCKMANN J, ABRAHAM D J, BLACK C M, VERZIJL N, DEGROOT J, HANEMAAIJER R, TEKOPPELE J M, HUIZINGA T W, BANK R A.

Identification of PLOD2 as Telopeptide Lysyl Hydroxylase, an Important Enzyme in Fibrosis. **The journal of biological chemistry**. v. 278(42), p. 40967–40972. 2003.

VAN DIJK F S, COBBEN J M, KARIMINEJAD A, MAUGERI A, NIKKELS P G J, VAN RIJN R R, PAULS G. Osteogenesis imperfecta: a review with clinical examples. **Molecular syndromology**. v.2(1) p. 1. 2011a.

VAN DIJK F S, NIKKELS P G, DEN HOLLANDER N S, NESBITT I M, VAN RIJN R R, COBBEN J M, PALS G. Lethal/severe osteogenesis imperfecta in a large family: a novel homozygous LEPRE1 mutation and bone histological findings. **Pediatric and Developmental Pathology**. v. 14(3), p.228-234. 2011b.

VAN DIJK F S; COBBEN J M; MAUGERI A; NIKKELS P G; VAN RIJN R R; PALS G. Osteogenesis imperfecta: clinical and genetic heterogeneity. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**. v. 156 (21), p. 4585. 2012.

VOLODARSKY M, MARKUS B, COHEN I, STARETZ-CHACHAM O, FLUSSER H, LANDAU D, SHELEF I, LANGER Y, BIRK O S. A deletion mutation in TMEM38B associated with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. **Hum Mutat**.v. 34, p.582–586. 2013.

WIGGINS S, KREIKEMEIER R. Bisphosphonate therapy and osteogenesis imperfecta: The lived experience of children and their mothers. **J Spec Pediatr Nurs**. v. 22(4), p. e12192. 2017.

WILLAERT A, MALFAIT F, SYMOENS S, GEVAERT K, KAYSERILI H, MEGARBANE A, MORTIER G, LEROY J G, COUCKE P J, DE PAEPE A. Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. **J Med Genet**.; v. 46, p.233–241. 2009.

ZELENSKI N G, RAWSON R B, BROWN M S, GOLDSTEIN J L. Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. **J Biol Chem**. v. 274, p. 21973–21980. 1999.