



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Investigação de mutações nos genes *LEPRE1*, *CRTAP*,
PPIB, *FKBP10*, *SERPINH1* e *SERPINF1* causadoras da
Osteogênese Imperfeita recessiva

Clara Fernanda Barbirato Furtado

Vitória - ES

2015



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

CLARA FERNANDA BARBIRATO FURTADO

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES *LEPRE1*,
CRTAP, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* E *SERPINF1*
CAUSADORAS DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA
RECESSIVA**

VITÓRIA - ES
2015

CLARA FERNANDA BARBIRATO FURTADO

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES *LEPRE1*,
CRTAP, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* E *SERPINF1*
CAUSADORAS DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA RECESSIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Flavia de Paula

VITÓRIA

2015

CLARA FERNANDA BARBIRATO FURTADO

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES *LEPRE1*,
CRTAP, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* E *SERPINF1*
CAUSADORAS DA OSTEOGÊNESE IMPERFEITA RECESSIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em 13 fevereiro de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Flávia de Paula (Orientadora)
Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo

Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho
Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Dra. Melissa de Freitas Cordeiro-Silva
Faculdade Salesiana de Vitória

“Pouca gente, se é que alguém o fez, parece ter compreendido o mais autêntico princípio da realidade: novo conhecimento conduz sempre a mistérios ainda mais espantosos.

Maior conhecimento fisiológico do cérebro torna a existência da alma menos possível, ainda que mais provável pela própria natureza da pesquisa.”

Stephen King

AGRADECIMENTOS

- A Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM), ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), pela possibilidade de desenvolver este trabalho.
- A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.
- À equipe do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG) pela colaboração.
- Aos pacientes, que aceitaram participar deste trabalho e compartilharam comigo um pouco de suas histórias de vida.
- À Prof^a Dra. Flavia de Paula, pela orientação, pelos ensinamentos, pelo carinho e pela paciência ao longo de tantos anos.
- Aos membros da comissão examinadora, pela disponibilidade de participar da banca e pelas contribuições para o enriquecimento do trabalho.
- À minha mãe, por tudo! Por ser sempre a minha maior incentivadora e por acreditar em mim incondicionalmente. Ao Leandro e à minha avó, obrigada pelo apoio e incentivo, sempre.
- Ao Victor, pelo amor, pela paciência, pelas ‘trocas de ideias’ e pela parceria. Obrigada, também, por ter me ouvido praticar todas as apresentações que precisei fazer até hoje!
- À minha família e aos meus amigos.
- A todos os colegas e amigos, antigos e recentes, do NGHM. Não vou citar nomes para não correr o risco de deixar, injustamente, alguém de fora. Um obrigada especial ao Márcio, parceiro e amigo desde o início de toda esta jornada; a Dani e a Leila, pela companhia, pelas risadas, pela ajuda e pela amizade; a Raquel Spinassé, que compartilhou comigo muitas angústias, dúvidas e ideias durante o doutorado; a Lorena, Thaísa e Jéssica, pelos dados fornecidos; e a Maíra, por toda a ajuda sem a qual eu provavelmente estaria na bancada realizando experimentos até agora.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese é apresentada em formato de artigos científicos.
As listas de figuras, quadros e siglas contêm as ilustrações, quadros e siglas apresentadas na introdução, na revisão bibliográfica e na metodologia deste trabalho.

RESUMO

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença clínica e geneticamente heterogênea caracterizada, predominantemente, por fragilidade e deformidade ósseas e por fraturas recorrentes. A maioria dos casos de OI resulta de mutações autossômicas dominantes nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, que codificam as cadeias formadoras do colágeno tipo I, principal proteína dos ossos. Nos últimos anos, um número crescente de casos decorrentes de mutações recessivas vem sendo relatado em genes associados à biossíntese do colágeno tipo I ou à formação e a mineralização óssea, como os genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PIIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* e *SERPINF1*. Mutações nesses genes, em geral, levam ao desenvolvimento de fenótipos graves e letais de OI. Neste trabalho, foram analisados os genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PIIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* e *SERPINF1* de 25 pacientes com OI utilizando-se as técnicas de SSCP e sequenciamento. Ao todo, 29 variações genéticas foram detectadas, entre mutações e polimorfismos. Das onze variações encontradas no gene *LEPRE1*, estão a já bem descrita c.1080+1G>T e as mutações potencialmente deletérias c.2024G>A / p.Lys363Glu e c.1501C>T / p.Arg501Trp. No gene *FKBP10*, foi encontrada a também descrita duplicação c.831dupC, além da c.1546G>A / p.Leu516Phe, predita como causadora da doença. Observou-se que os genes *FKBP10* e *LEPRE1* contêm as principais mutações encontradas neste trabalho e sugere-se que os mesmos sejam preferencialmente analisados em estudos de triagem e identificação de mutações em OI. Até o momento, não existem relatos de mutações nos genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PIIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* e *SERPINF1* em pacientes brasileiros e este trabalho fornece novas informações sobre os aspectos genéticos da OI recessiva.

Palavras-chave: Osteogênese Imperfeita recessiva – mutações e polimorfismos – SSCP - *LEPRE1/CRTAP/PIIB* – *FKBP10/SERPINH1/SERPINF1*

ABSTRACT

Osteogenesis Imperfecta (OI) is a clinically and genetically heterogeneous disease predominantly characterized by bone fragility and deformity and recurrent fractures. Most cases of OI result of autosomal dominant mutations in *COL1A1* and *COL1A2* genes that encode the chains forming type I collagen, the main protein in bones. In the past few years, an increasing number of cases due to recessive mutations has been reported in genes associated with the biosynthesis of type I collagen or to the formation and bone mineralization, such as *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* and *SERPINF1*. Mutations in these genes, in general, lead to the development of severe and lethal OI phenotypes. In this work, *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* and *SERPINF1* of 25 OI patients were analyzed using SSCP and automated sequencing. Altogether, 29 genetic variations were detected, mutations and polymorphisms. Among the eleven variants found in *LEPRE1* gene, there are the already well described c.1080 + 1G> T and the potentially deleterious mutations c.2024G> A / p.Lys363Glu and c.1501C> T / p.Arg501Trp . In *FKBP10* gene, the previously described duplication c.831dupC, and c.1546G>A / p.Leu516Phe, predicted to be disease causing, were detected. It was observed that *FKBP10* and *LEPRE1* contain the most important mutations found in the patients studied in this work and it is suggested that *LEPRE1* and *FKBP10* should be preferably analyzed in studies of screening and identification of mutations in patients with OI. To date, there are no reports of mutations in *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* and *SERPINF1* genes in Brazilian patients and this study provides new information on the genetic aspects of recessive OI.

Keywords: Recessive Osteogenesis Imperfecta – mutations and polymorphisms – SSCP – *LEPRE1/CRTAP/PPIB* – *FKBP10/SERPINH1/SERPINF1*

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 – Estrutura do colágeno tipo I	24
Figura 2 – Visão geral da biossíntese do colágeno tipo I	26
Figura 3 – Mecanismos que contribuem para a Osteogênese Imperfeita	35
Quadro 1 – Classificação da Osteogênese Imperfeita	20
Quadro 2 – Escala de gravidade da Osteogênese Imperfeita	21
Quadro 3 – Primers utilizados na amplificação dos fragmentos do gene <i>LEPRE1</i>	43
Quadro 4 – Primers utilizados na amplificação dos fragmentos do gene <i>CRTAP</i>	44
Quadro 5 – Primers utilizados na amplificação dos fragmentos do gene <i>PPIB</i>	44
Quadro 6 – Primers utilizados na amplificação dos fragmentos do gene <i>FKBP10</i>	45
Quadro 7 – Primers utilizados na amplificação dos fragmentos do gene <i>SERPINH1</i>	46
Quadro 8 – Primers utilizados na amplificação dos fragmentos do gene <i>SERPINF1</i>	47

LISTA DE SIGLAS

a.C.	antes de Cristo
AD	autossômico dominante
AR	autossômico recessivo
BMP1	proteína morfogenética tipo 1 (<i>bone morphogenetic protein 1</i>)
COL1A1	colágeno tipo I, alfa I
COL1A2	colágeno tipo I, alfa II
CREB3L1	proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (<i>cAMP responsive element binding protein 3-like 1</i>)
CRTAP	proteína associada à cartilagem (<i>cartilage associated protein</i>)
CyPB	ciclofilina B (<i>cyclophilin B</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>FKBP10</i>	gene da proteína de ligação FK506 (<i>FK506 binding protein 10, 65kDa</i>)
FKBP65	proteína de ligação a FK506, 65kDa
HSP47	proteína de choque térmico (<i>heat shock protein 47</i>)
IFITM5	proteína transmembrana induzida por interferon (<i>interferon induced transmembrane protein 5</i>)
LEPRE1	proteoglicano 1 enriquecido em leucina prolina (<i>leucine proline-enriched proteoglycan – leprecan – 1</i>)
OI	Osteogênese Imperfeita

P3H1	prolil 3 hidroxilase-1
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEDF	fator derivado do epitélio pigmentado (<i>pigment epithelium-derived factor</i>)
PPIase	peptidil-prolil cis-trans isomerase
<i>PPIB</i>	gene da ciclofilina B
PLOD2	Lisina 2-oxoglutarato 5-dioxigenase 2 (<i>procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i>)
SERPINF1	inibidor da serpina peptidase, grupo F, membro 1 [<i>serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1</i>]
SERPINH1	inibidor da serpina peptidase, grupo H, membro 1 [<i>serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)</i>]
SP7	Fator de transcrição SP7
SSCP	polimorfismo conformacional de fita simples (<i>single-strand conformation polymorphism</i>)
TMEM38B	proteína transmembrana 38B (<i>transmembrane protein 38B</i>)
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
WNT1	Proteína de integração ao MMTV, membro 1 (<i>wingless-type MMTV integration site family, member 1</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 HISTÓRICO	16
2.2 CARACTERIZAÇÃO	17
2.3 CLASSIFICAÇÃO	18
2.4 COLÁGENO TIPO I	23
2.5 OS GENES <i>LEPRE1</i> , <i>CRTAP</i> , <i>PPIB</i> , <i>FKBP10</i> , <i>SERPINH1</i> E <i>SERPINF1</i> E A OSTEOGÊNESE IMPERFEITA RECESSIVA	25
2.5.1 <i>LEPRE1</i> , <i>CRTAP</i> e <i>PPIB</i>	27
2.5.2 <i>SERPINH1</i> e <i>FKBP10</i>	29
2.5.3 <i>SERPINF1</i>	31
2.6 OS ASPECTOS GENÉTICOS DA OI E AS CORRELAÇÕES ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO	32
2.7 ESTUDOS E ESTRATÉGIAS MOLECULARES DE DETECÇÃO DE MUTAÇÕES CAUSADORAS DA OI	36
3 PACIENTES E METODOLOGIA	39
3.1 AMOSTRAS	39
3.2 EXTRAÇÃO DO DNA	40
3.3 CHECAGEM DO DNA EXTRAÍDO	42
3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	42
3.5 TRIAGEM DE MUTAÇÕES	48
3.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE ALTERAÇÕES	49
4 OBJETIVOS	50
4.1 OBJETIVO GERAL	50
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
6 ARTIGOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DA TESE.....	60
6.1 MANUSCRITO 1	60
6.2 MANUSCRITO 2	79
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97

1 INTRODUÇÃO

A Osteogênese Imperfeita (OI) é uma doença genética caracterizada por uma grande variabilidade clínica, podendo apresentar-se de forma branda, em que os sinais são leves e o paciente possui poucas limitações físicas, até a forma letal, com morte intraútero ou nos primeiros momentos após o nascimento.

Popularmente, a OI é conhecida como “doença dos ossos de vidro”, “doença dos ossos de cristal” ou “doença dos ossos frágeis”, devido aos principais sinais apresentados pela maioria dos pacientes: fragilidade óssea com fraturas recorrentes. Além disso, deformidade óssea, baixa estatura, esclera azulada, dentinogênese imperfeita e perda precoce da audição são sinais frequentemente observados.

A OI afeta aproximadamente 1 em cada 15.000 a 20.000 indivíduos (FORLINO et al., 2011). Assim, estima-se que no Brasil existam cerca de 9.500 a 13.000 portadores da doença.

Tradicionalmente, classifica-se a doença em quatro tipos, com base em aspectos clínicos e radiológicos. A OI tipo I é a forma mais branda da doença, a tipo II é a forma letal, a tipo III é a forma mais grave não letal e a OI tipo IV é a forma mais comum e heterogênea da doença (SILLENCE, SENN E DANKS, 1979).

A maioria dos casos apresenta padrão de herança autossômico dominante, sendo causada por mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*. Esses genes codificam, respectivamente, as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$, formadoras do colágeno tipo I, uma das proteínas estruturais mais importantes dos ossos, da pele e dos tendões (BARSH; BYERS, 1981; GAJKO-GALICKA, 2002; CANTY; KADLER, 2005). Em 1983, foi descrita a primeira mutação causadora da OI, uma deleção no gene *COL1A1* (CHU et al., 1983). No ano seguinte, foi relatado o primeiro caso resultante de mutação em *COL1A2*. (PIHLAJANIEMI et al., 1984). Atualmente, já foram descritas mais de 1200 mutações diferentes nos genes *COL1A1* e *COL1A2* (DALGLEISH, 1998). Os fenótipos decorrentes de mutações autossômicas dominantes em *COL1A1* ou

COL1A2 são muito variáveis, podendo ser expressa desde a forma leve até a forma letal de OI.

Além dos casos autossômicos dominantes, é crescente na literatura o número de casos decorrentes de mutações autossômicas recessivas. Em sete anos, treze genes foram associados às formas recessivas de OI: *LEPRE1* (CABRAL et al., 2007), *CRTAP* (MORELLO et al., 2006), *PPIB* (van DIJK et al., 2009a), *FKBP10* (ALANAY et al., 2010), *SERPINH1* (CHRISTIANSEN et al., 2010), *SERPINF1* (BECKER et al., 2011), *PLOD2* (PUIG-HERVÁS et al., 2012), *TMEM38B* (SHAHEEN et al., 2012), *BMP1* (MARTÍNEZ-GLEZ et al., 2012), *WNT1* (FAHIMINIYA et al., 2013), *SP7* (LAPUNZINA et al., 2010) e *CREB3L1* (SYMOENS et al., 2013). O maior número de mutações autossômicas recessivas causadoras da OI foi verificado nos genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* e *SERPINF1*. Em geral, as tais mutações estão associadas a fenótipos graves e/ou letais.

Já foram, também, relatados casos de mutações novas para a doença (BYERS; TSIPOURAS; BONADIO, 1988). Além disso, alguns pacientes herdam a mutação patogênica de um dos pais, que apresentam mosaïcismo gonadal e pouca ou nenhuma anormalidade (LUND et al., 1997; ZLOTOGORA, 1998; PYOTT et al., 2011; YAMADA et al., 2012).

Assim, fica evidente que, além da heterogeneidade clínica, a OI apresenta, também, grande heterogeneidade genotípica.

Atualmente, o diagnóstico é dado analisando-se, predominantemente, os aspectos clínicos do paciente. Entretanto, o diagnóstico clínico, apenas, pode não ser tão preciso. A presença de esclera azulada, por exemplo, é uma característica altamente sugestiva, mas não é necessariamente um sinal patognomônico de OI. Outro exemplo é a dentinogênese imperfeita, que é verificada mais frequentemente na primeira dentição do que na dentição permanente (GLORIEUX, 2008).

Dentro deste contexto, os estudos moleculares são ferramentas muito úteis para o diagnóstico da OI. Através da identificação de mutações em pacientes dos quais já foram obtidas as informações sobre os fenótipos, é possível obter um melhor esclarecimento sobre a relação entre os locais e tipos de mutações e os fenótipos decorrentes dessas alterações. Quanto maior o número de informações acerca dos

aspectos genéticos da OI, melhores são as possibilidades de se fornecer um diagnóstico precoce e mais preciso, imprescindível para um tratamento adequado, possibilitando uma melhor qualidade de vida aos pacientes portadores desta doença (HOROVITZ; MATTOS; LLERENA, 2004).

Assim, realizar a detecção de mutações causadoras da OI, bem como identificar a presença de polimorfismos não patogênicos dentro da população são peças imprescindíveis para otimizar o diagnóstico molecular para a doença, além de fornecer informações para um melhor aconselhamento genético sobre a OI.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

A Osteogênese Imperfeita (OI; MIMs 166200, 166210, 259420, 166220, 610967, 613982, 610682, 610915, 259440, 613848, 610968, 613849, 614856, 613982, 610967, 615220) é reconhecida como doença desde o século XVII, mas foi chamada de Osteomalácia Congênita até o final do século XIX (ROUGHLEY; RAUCH; GLORIEUX, 2003), quando o nome *Osteogenesis Imperfecta* foi introduzido por Willem Vrolik. No *Handbook of Pathological Anatomy* (1842-1844) e no *Tabulae* (1842-1849), Willem Vrolik descreveu o caso de um recém-nascido que morreu três dias após o nascimento. O corpo apresentava inúmeras fraturas e era muito mal desenvolvido. No esqueleto, foram verificadas diversas características peculiares que, hoje, são reconhecidas como sendo características de pacientes com OI (BALJET, 2002).

Existem relatos de OI desde a Antiguidade. Em um estudo de paleopatologia, Lowenstein (2009) descreve uma múmia egípcia, datada do ano de 1.000 a.C., que apresenta alterações no esqueleto, nos dentes e nos ossos longos típicas de portadores de OI (LOWENSTEIN, 2009).

A primeira descrição científica da doença foi dada pelo cirurgião sueco Olaus Jakob Ekman, em 1788, e foi Edmond Axman, em 1831, quem primeiro descreveu algumas das principais características da OI, como fragilidade óssea, hipermobilidade das articulações e esclera azulada (BALJET, 2002).

2.2 CARACTERIZAÇÃO

A OI, também conhecida com “doença dos ossos frágeis”, é uma doença genética que afeta um a cada 15.000 – 20.000 indivíduos (FORLINO et al., 2011) e apresenta um quadro clínico bastante heterogêneo. Apesar de os sinais, os sintomas e a gravidade da doença variarem muito de um caso para outro, algumas características são tipicamente verificadas em grande parte dos pacientes com OI, como fragilidade óssea, deformidade dos ossos longos, fraturas ósseas recorrentes, baixa estatura, esclera azulada, perda precoce da audição e dentinogênese imperfeita.

Sabe-se que a maioria dos casos são decorrentes de mutações autossômicas dominantes nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, que codificam, respectivamente, as cadeias de pró-colágeno $\alpha 1$ e $\alpha 2$, formadoras do colágeno tipo I, uma das proteínas estruturais mais importantes do osso, da pele e dos tendões (BARSH; BYERS, 1981; GAJKO-GALICKA, 2002; CANTY; KADLER, 2005). Em 2012, foram detectadas as primeiras mutações autossômicas dominantes no gene *IFITM5*, que codifica uma proteína transmembrana osteoblasto-específica cuja função parece estar relacionada à mineralização óssea (CHO et al., 2012; SEMLER et al., 2012; MOFFATT et al., 2008).

Ainda, é crescente na literatura o número de casos de OI decorrentes de mutações autossômicas recessivas localizadas nos genes *LEPRE1* (CABRAL et al., 2007), *CRTAP* (MORELLO et al., 2006), *PPIB* (VAN DIJK et al., 2009a), *FKBP10* (ALANAY et al., 2010), *SERPINH1* (CHRISTIANSEN et al., 2010), *SERPINF1* (BECKER et al., 2011), *PLOD2* (PUIG-HERVÁS et al., 2012), *TMEM38B* (SHAHEEN et al., 2012), *BMP1* (MARTÍNEZ-GLEZ et al., 2012), *WNT1* (FAHIMINIYA et al., 2013), *SP7* (LAPUNZINA et al., 2010) e *CREB3L1* (SYMOENS et al., 2013).

Já foram, também, relatados casos de mutações novas para a doença (BYERS; TSIPOURAS; BONADIO, 1988). Além disso, alguns pacientes herdam a mutação patogênica de um dos pais, que apresentam mosaicismos gonadais e pouca ou nenhuma anormalidade (LUND et al., 1997; ZLOTOGORA, 1998; PYOTT et al., 2011a; YAMADA et al., 2012).

A terapia padrão para o tratamento da OI é a aplicação intravenosa cíclica de pamidronato dissódico. A administração intermitente desse medicamento promove, aos pacientes de OI, redução da dor crônica, aumento da massa óssea e redução do nível de incapacidade física, reduzindo o número de fraturas recorrentes, controlando a progressão da doença e aumentando substancialmente a mobilidade e a qualidade de vida dos pacientes. (ACKAY et al., 2008; RAUCH et al., 2009; GLORIEUX et al., 1998).

2.3 CLASSIFICAÇÃO

A primeira forma de classificação para a OI se deu no início do século XX, quando a doença passou a ser subdividida nas formas congênita (grave) e *tarda* (branda). No entanto, à medida que um maior número de pacientes foi sendo avaliado, a variedade clínica da doença ficou evidente e foi necessário o desenvolvimento de um novo sistema de classificação (ROUGHLEY; RAUCH; GLORIEUX, 2003).

Em 1979, após a realização de um estudo epidemiológico e genético (baseado em histórico familiar) com 180 pacientes com OI, Sillence, Senn e Danks (1979), propuseram uma nova classificação para a OI em quatro tipos:

- OI tipo I representa a forma mais branda da doença. Os pacientes apresentam estatura bem próxima do normal, pouca ou nenhuma deformidade óssea, fragilidade óssea de leve a moderada, esclera azulada e perda precoce da audição. A dentinogênese imperfeita pode estar presente ou ausente.

- OI tipo II representa a forma mais grave por ser letal no período perinatal, na maioria dos casos, ou nos primeiros dias de vida. Os pacientes sofrem de extrema fragilidade e deformidade ósseas. Insuficiência respiratória, hemorragias e malformações no sistema nervoso central são as principais causas de morte.

- OI tipo III é a forma não letal mais grave. Compreende pacientes que apresentam face triangular, estatura muito baixa, deformidades ósseas progressivas, fraturas múltiplas, dentinogênese imperfeita e perda de audição.

- OI tipo IV é a forma mais comum e mais heterogênea da doença, com gravidade moderada. Agrupa os pacientes que apresentam estatura variável, deformidade óssea branda a moderada, fragilidade óssea variável, osteoporose e curvatura em ossos longos. A dentinogênese imperfeita também pode estar presente ou ausente.

Por muitos anos, a classificação proposta por Sillence, Senn e Danks (1979) foi utilizada para diferenciar as várias formas de OI de acordo com a gravidade da doença. Entretanto, com a evolução dos estudos em OI, com a observação de fenótipos peculiares e, principalmente, com a identificação de novos genes associados à doença, outras classificações foram sendo propostas ao longo dos anos com o objetivo de incluir todos os dados clínicos, histológicos, radiológicos e genéticos descobertos.

Em um trabalho publicado em 2010, Van Dijk e colaboradores propuseram uma nova classificação para a OI em seis tipos. A proposta consiste em manter alguns aspectos da classificação tradicional, mas sugere modificações, especialmente no que se refere à localização das mutações causadoras dos diferentes tipos de OI. No trabalho, é proposto que a OI tipo I está associada apenas a mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, enquanto que as formas II – IV podem ser resultantes de mutações nesses dois genes, além do *CRTAP*, *LEPRE1* e *PPIB*. O tipo V permanece devido às características clínicas, radiológicas e histológicas peculiares e o tipo VI engloba pacientes com características histológicas únicas, mas sem peculiaridades quanto ao quadro clínico e radiológico. De acordo com a proposta, pacientes com os tipos V ou VI de OI serão diagnosticados pelos fenótipos apresentados, independentemente do local onde ocorrem as mutações (VAN DIJK et al., 2010).

Em 2011, Forlino e colaboradores propuseram uma classificação para a OI em 11 tipos. De acordo com a proposta, OI tipo I limita-se a casos de haploinsuficiência do colágeno tipo I. OI tipos II, III e IV seguem a descrição tradicional de Sillence, Senn e

Danks (1979) e são resultados de mutações autossômicas dominantes em *COL1A1* ou *COL1A2*. O tipo V também resulta de mutações autossômicas dominantes, porém em outros genes, e apresenta defeitos de mineralização e características histológicas peculiares. Os tipos VI a XI são decorrentes de mutações autossômicas recessivas nos genes *SERPINF1*, *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *SERPINH1* e *FKBP10*, respectivamente.

Atualmente, devido à descoberta de novos genes e a observação de novos fenótipos associados a OI, uma classificação genética e molecular (Quadro 1) inclui 12 tipos que apresentam padrões de herança autossômicos dominantes e recessivos e exibem extensas variações clínicas (MARINI; BLISSETT, 2013).

Quadro 1 – Classificação da Osteogênese Imperfeita

TIPO DE OI		PADRÃO DE HERANÇA	GENE	FENÓTIPO
Tipos clássicos (SILLENCE; SENN; DANKS, 1979)	I	AD	<i>COL1A1</i> (alelo nulo)	Leve, sem deformidade óssea
	II	AD	<i>COL1A1</i> ou <i>COL1A2</i>	Letal
	III	AD	<i>COL1A1</i> ou <i>COL1A2</i>	Deformidade progressiva
	IV	AD	<i>COL1A1</i> ou <i>COL1A2</i>	Deformidade moderada
Sem mutações em <i>COL1A1</i> / 2	V	AD	<i>IFITM5</i>	Histologia distinta
Defeitos de mineralização	VI	AR	<i>SERPINF1</i>	Histologia distinta
Defeitos de 3-hidroxilação	VII	AR	<i>CRTAP</i>	Grave a letal
	VIII	AR	<i>LEPRE1</i>	Grave a letal
	XIX	AR	<i>PPIB</i>	Moderado a letal
Defeitos de chaperonas	X	AR	<i>SERPINH1</i>	Grave
	XI	AR	<i>FKBP10</i>	Deformidade progressiva
Defeitos de clivagem do pró-peptídeo C	XII	AR	<i>BMP1</i>	Grave
Defeitos do fator de transcrição zinc-finger			<i>SP7</i>	Moderado
Defeito do canal de cátion	Sem classificação		<i>TMEM38B</i>	Moderado a grave
Defeito da proteína sinalizadora			<i>WNT1</i>	Moderado; deformidade progressiva

Adaptada de MARINI; BLISSETT, 2013.

Observações: O gene *CREB3L1* não foi incluído no quadro, pois a descrição da primeira mutação para OI em *CREB3L1* foi realizada após a publicação desta revisão. Atualmente, sabe-se que as mutações neste gene resultam em fenótipos graves a letais.

Acredita-se que o gene *PLOD2* não tenha sido incluído, pois o maior número de mutações neste gene resultam na Síndrome de Bruck, que apresenta um fenótipo semelhante a OI, porém com características singulares. Assim, não são todos os pesquisadores que incluem o *PLOD2* entre os genes causadores da OI.

A grande variabilidade fenotípica para OI tornou evidente a necessidade de se padronizar internacionalmente os critérios utilizados para determinar a gravidade da doença entre os indivíduos afetados e as possibilidades de tratamento para os pacientes com OI. Por esta razão, Van Dijk e Silience (2014) propuseram uma escala de gravidade baseada em dados clínicos e históricos, frequência de fraturas, densitometria óssea e nível de mobilidade. Além disso, a escala também contém um guia geral para dados clínicos pré-natais e dados de ultrassonografia (Quadro 2). A escala já foi utilizada em estudos envolvendo 231 crianças com OI avaliadas por 22 profissionais de 11 países. De acordo com os criadores da escala, a mesma necessita ser validada com a colaboração de centros especializados avaliando um maior número de pacientes para confirmar sua utilidade clínica (VAN DIJK; SILLENCE, 2014).

Quadro 2 – Escala de gravidade da Osteogênese Imperfeita

OI LEVE
<i>Dados de ultrassom com até 20 semanas de gestação</i>
Sem fraturas e curvatura dos ossos
<i>Dados pós-natais</i>
Raras fraturas congênitas
Altura e velocidade de crescimento normais ou próximas do normal
Ossos longos retos, sem deformidades
Capacidade de deambulação na ausência de fraturas
Mínimas fraturas vertebrais por esmagamento
Densidade mineral óssea da coluna lombar entre -1,5 e +1,5
Taxa anual de fraturas menor ou igual a 1
Ausência de dor óssea crônica ou dor mínima controlada por analgésicos simples
Frequência escolar regular; não falta à escola por dores, letargia ou fadiga
OI MODERADA
<i>Dados de ultrassom com até 20 semanas de gestação</i>
Raras fraturas e curvatura dos ossos, podendo aumentar no último trimestre

Quadro 2 – Escala de gravidade da Osteogênese Imperfeita (continuação)*Dados pós-natais (não alterados com a administração de bisfosfonatos)*

Fraturas congênitas ocasionais
 Baixa estatura e velocidade de crescimento reduzida
 Arqueamento anterior de pernas e coxas
 Arqueamento de ossos longos devido à imobilização por fraturas recorrentes
 Fraturas vertebrais por esmagamento
 Densidade mineral óssea da coluna lombar em geral entre -2,5 e -1,5
 Taxa anual de fraturas pré-puerais maior do que 1 (média de 3, podendo variar muito)
 Ausência na escola devido a dor por mais de 5 dias por ano

OI GRAVE*Dados de ultrassom com até 20 semanas de gestação*

Encurtamento de ossos longos
 Fraturas ou arqueamento dos ossos longos com deficiência na modelagem óssea
 Costelas finas com ausência de fraturas ou fraturas descontínuas
 Mineralização reduzida

Dados pós-natais (não alterados com a administração de bisfosfonatos)

Deficiência acentuada no crescimento linear
 Dependente de cadeira de rodas
 Deformidade progressiva dos ossos longos e da coluna vertebral (não relacionada a fraturas)
 Densidade mineral óssea da coluna lombar geralmente menor do que -3,0
 Taxa anual de fraturas pré-puerais maior do que 3 (varia com a idade)
 Dor óssea crônica se não tratado com bisfosfonatos
 Muitas ausências na escola devido a fraturas, fadiga ou dor.

OI EXTREMAMENTE GRAVE*Dados de ultrassom com até 20 semanas de gestação*

Encurtamento dos ossos longos
 Fraturas e/ou arqueamento dos ossos longos com grave deficiência na modelagem óssea
 Costelas grossas 'em contas' devido a múltiplos pontos de fraturas, ou costelas finas
 Mineralização óssea

Dados pós-natais

Coxas em abdução e rotação externa fixa com limitação dos movimentos da maioria das articulações
 Indicadores clínicos de dor crônica grave (palidez, sudorese, choro ou expressão de dor)
 Diminuição da ossificação do crânio, múltiplas fraturas de ossos longos e costelas. Tórax pequeno.
 Encurtamento e deformidade do fêmur
 Esmagamento de todas as vértebras
 Dificuldade respiratória, levando à morte perinatal
 Morte perinatal

2.4 COLÁGENO TIPO I

O colágeno tipo I é uma proteína fibrosa que pertence à família dos colágenos, proteínas codificadas por mais de 30 genes e que compõem muitos tecidos no corpo (MOONEY; KLEIN, 2002). Os colágenos são as proteínas mais abundantes do corpo humano, compondo cerca de 30% de sua massa protéica (MYLLYHARJU E KIVIRIKKO, 2004).

O colágeno tipo I é a principal proteína que constitui dos ossos, representando 90% de todo o conteúdo protéico desses tecidos. É, ainda, a principal proteína da pele, dos tendões, da parede de vasos sanguíneos e de outros tecidos conjuntivos, com exceção de cartilagens (BYERS, 2000; BISHOP, 2010).

Altamente resistente à tensão, a molécula do colágeno tipo I é composta de três subunidades: duas cadeias de pró-colágeno alfa 1, codificadas pelo gene *COL1A1* e uma cadeia de pró-colágeno alfa 2, codificada pelo gene *COL1A2* (Figura 1). Estas cadeias são unidas inicialmente na porção C-terminal e a interação das mesmas se propaga para a porção N-terminal formando uma hélice tripla (CANTY; KADLER, 2005).

Cada cadeia contém cerca de 1000 aminoácidos e é composta de 338 repetições ininterruptas de Glicina - Xaa - Yaa, onde Xaa é frequentemente prolina e Yaa, hidroxiprolina (FORLINO; MARINI, 2000). A glicina, devido ao seu pequeno tamanho, está relacionada ao dobramento e a estabilidade da tripla hélice do colágeno tipo I, sendo o único aminoácido compacto o suficiente para ocupar a posição axial da hélice, sendo necessária nas junções onde as três cadeias estão em contato. Por essa razão, mutações que resultam em substituições da glicina por outros aminoácidos perturbam muito a estrutura helicoidal da molécula do colágeno tipo I. Tais alterações compreendem aproximadamente 85% das mutações identificadas no gene *COL1A1* (BISHOP, 2010; DALGLEISH, 1998).

A molécula é, ainda, caracterizada pela presença de um domínio em tripla hélice de 300nm de comprimento, flanqueado por dois domínios globulares terminais

conhecidos como pró-peptídeos N e C, que não são formados pelas repetições Glicina-Xaa-Yaa (CANTY; KADLER, 2005).

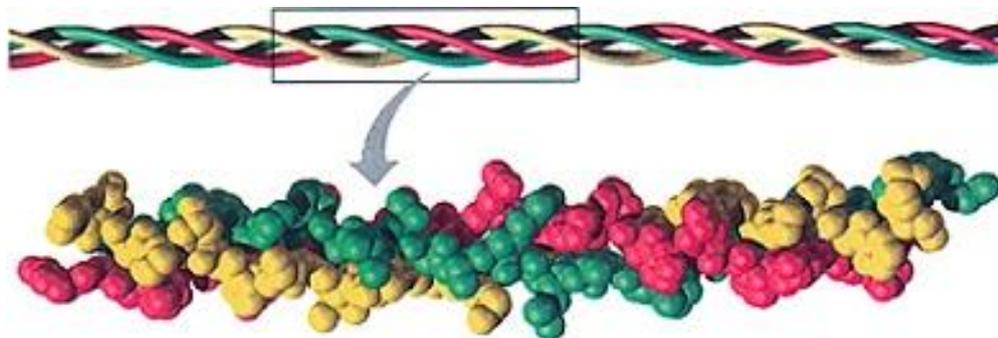


Figura 1 – Estrutura do colágeno tipo I

Fonte (modificado): http://web.mit.edu/3.082/www/team1_f02/collagen.htm.

Original de <http://www2.mcdaniel.edu/Chemistry/CH3321JPGs/Proteins>

A biossíntese do pró-colágeno tipo I ocorre no retículo endoplasmático das células e necessita de uma série de modificações pós-traducionais. Após a translocação das cadeias de pró-colágeno tipo I para o retículo endoplasmático, múltiplos resíduos de lisina e prolina são hidroxilados ao longo da molécula pela lisil hidroxilase e por prolil hidroxilases, respectivamente. A hidroxilação dos resíduos de prolina aumenta a estabilidade da molécula e é um elemento chave para o dobramento da mesma. Cerca de um quarto dos resíduos de lisina e metade dos resíduos de prolina são hidroxilados nas moléculas normais de colágeno tipo I sintetizadas por fibroblastos em cultura.

Subsequentemente, alguns resíduos de hidroxiprolina são glicosilados pelas galactosil-transferase e glucosil-transferase. Os resíduos de lisina e prolina na região de formação da hélice nas cadeias do pró-colágeno tipo I estão acessíveis a estas modificações apenas quando as porções das cadeias em que estão localizados estão desdobradas. À medida que a tripla hélice vai sendo formada linearmente da extremidade carboxil para a extremidade amino da molécula, resíduos de lisina e prolina vão se tornando inacessíveis para modificação.

A associação prematura entre as cadeias é evitada por chaperonas como a HSP47 e a FKBP65 e por enzimas modificadoras do colágeno até que a biossíntese das cadeias esteja completa. A seleção das cadeias e a associação para a formação da tripla hélice são determinadas por pró-peptídeos C terminais nas moléculas de pró-colágeno tipo I (ISHIKAWA et al., 2009; MARINI et al., 2007). As proteínas não podem deixar o retículo endoplasmático até que tenham atingido a conformação correta (HAMMOND; HELENIUS, 1995).

Quando a molécula se encontra na conformação correta de tripla hélice, é transportada do retículo endoplasmático ao complexo de Golgi e secretada para fora das células (NAGATA, 2003). Uma vez no meio extracelular, os trímeros de pró-colágeno tipo I são processados em moléculas maduras de colágeno tipo I através da remoção proteolítica dos pró-peptídeos N e C terminais, expondo telopeptídeos curtos que se unem para formar agregados conhecidos como fibrilas. As fibrilas do colágeno tipo I são a principal fonte de resistência e definem a forma dos tecidos que constituem (CANTY; KADLER, 2005).

A visão geral da biossíntese do colágeno tipo I está esquematizada na figura 2.

2.5 OS GENES *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* E *SERPINF1* E A OSTEOGÊNESE IMPERFEITA RECESSIVA

Até o momento, mutações autossômicas recessivas causadoras da OI foram detectadas em doze genes: *LEPRE1* (CABRAL et al., 2007), *CRTAP* (MORELLO et al., 2006), *PPIB* (VAN DIJK et al., 2009a), *FKBP10* (ALANAY et al., 2010), *SERPINH1* (CHRISTIANSEN et al., 2010), *SERPINF1* (BECKER et al., 2011), *PLOD2* (PUIG-HERVÁS et al., 2012), *TMEM38B* (SHAHEEN et al., 2012), *BMP1* (MARTÍNEZ-GLEZ et al., 2012), *WNT1* (FAHIMINIYA et al., 2013), *SP7* (LAPUNZINA et al., 2010) e *CREB3L1* (SYMOENS et al., 2013).

Dentre esses, *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINF1*, *FKBP10* e *SERPINF1* são os genes com o maior número de mutações patogênicas descritas para OI e, por esta razão, foram os genes estudados neste trabalho.

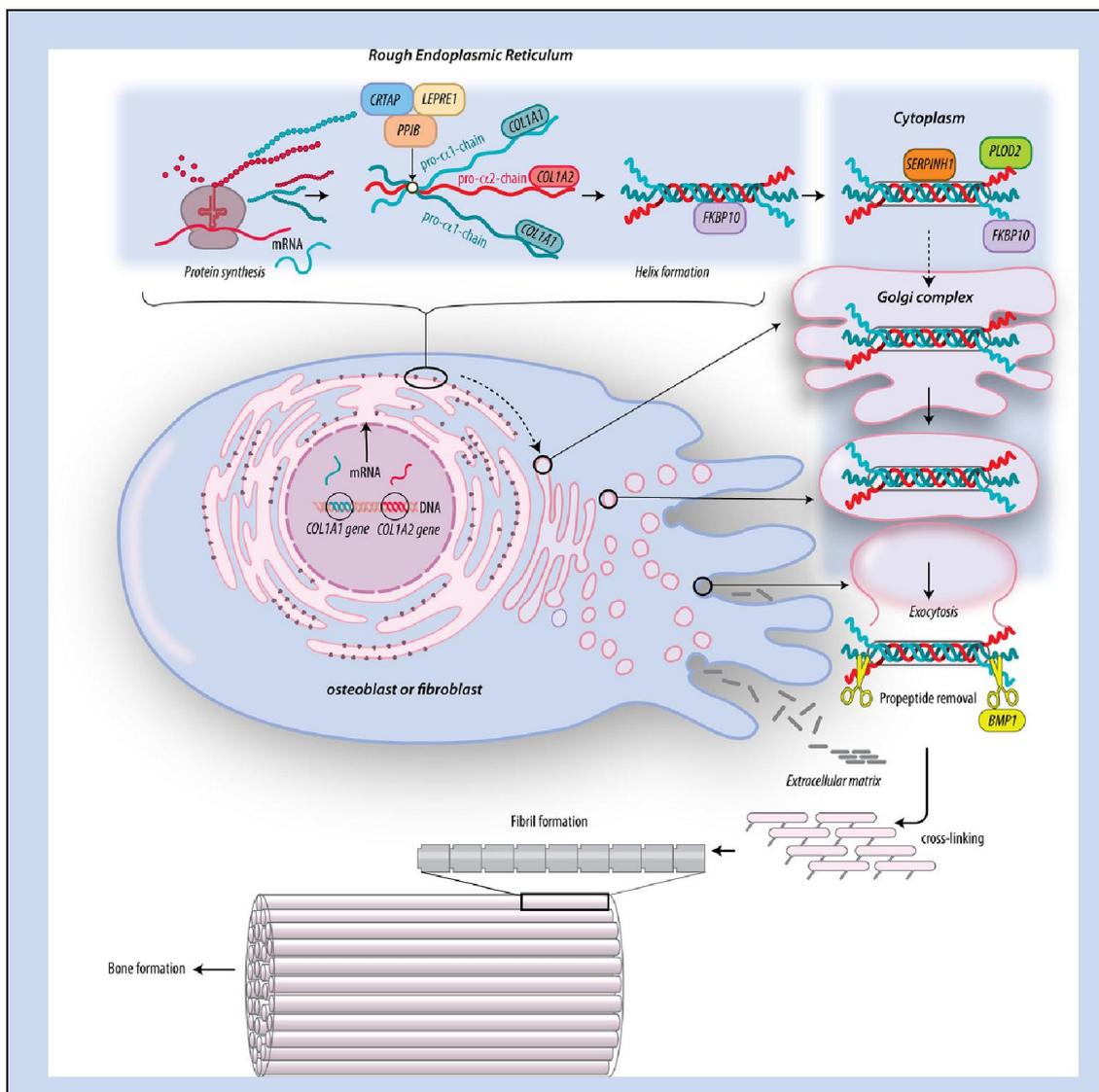


Figura 2 - Visão geral da biossíntese do colágeno tipo I. O colágeno tipo I consiste de duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2. Após a tradução, as cadeias pró-alfa 1 e pró-alfa 2 são processadas no retículo endoplasmático rugoso. Estas cadeias precisam se alinhar para que se inicie o processo de dobramento do pró-colágeno tipo I em tripla hélice. Durante este processo de dobramento, proteínas específicas realizam modificações pós-traducionais. Os genes que codificam as proteínas envolvidas nas modificações pós-traducionais e nos quais mutações causadoras de OI já foram descritas estão retratados nesta figura. Após o transporte do pró-colágeno tipo I ao complexo de Golgi e a exocitose para a matriz extracelular, a clivagem dos pró-peptídeos C e N resulta na formação do colágeno tipo I. Em seguida, ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno tipo I levam à formação das fibrilas. Múltiplas fibrilas de colágeno tipo I formam as fibras de colágeno, importantes constituintes dos ossos. Adaptado de VAN DIJK; SILLENCE, 2014.

2.5.1 *LEPRE1, CRTAP E PPIB*

As proteínas codificadas pelos genes *LEPRE1* (MIM 610339), *CRTAP* (MIM 605497) e *PPIB* (MIM 123841) trabalham em conjunto, na proporção de 1:1:1, formando um complexo de hidroxilação pós-traducional das moléculas de colágeno tipo I (VRANKA; SAKAI; BACHINGER, 2004).

O gene *LEPRE1* (*leucine proline-enriched proteoglycan – leprecan – 1*) está localizado no cromossomo 1p34.1 e é formado por 15 exons. Este gene codifica a prolil-3-hidroxilase 1 (P3H1), membro da família das prolil hidroxilases do colágeno. Membros desta família se encontram no retículo endoplasmático e catalisam modificações pós-traducionais específicas do colágeno necessárias para a síntese e a montagem dessas moléculas (NCBI GENE, acesso em julho de 2014).

O gene *CRTAP* (*cartilage associated protein*) está localizado no cromossomo 3p22.3 e possui sete exons. O gene codifica a proteína-cartilagem-associada (CRTAP), que possui 46.5 kDa e é formada por 401 aminoácidos (MARINI et al., 2007). A proteína CRTAP não possui uma função enzimática conhecida. Embora o colágeno em camundongos *CRTAP* *-/-* tenha mostrado uma redução na 3-hidroxilação da prolina, o mecanismo envolvido neste processo ainda não foi perfeitamente compreendido. Sabe-se que a CRTAP mantém os níveis de P3H1 normais e facilita a ligação da ciclofilina B (CyPB) ao colágeno (CHOI et al., 2009). CRTAP se liga a P3H1 e é necessária para que a 3-hidroxilação dos resíduos de prolina nas moléculas de pró-colágeno tipo I ocorra de maneira eficiente. Apesar desta ligação não ser essencial para a atividade da P3H1, a CRTAP parece facilitar sua associação às cadeias de pró-colágeno. Em humanos, a perda total da CRTAP está associada a uma drástica redução na 3-hidroxilação das moléculas de colágeno tipo I e resulta em fenótipos muito graves a letais de OI (MORELLO et al., 2006).

O gene *PPIB* (*peptidylprolyl isomerase B, cyclophilin B*) está localizado no cromossomo 15q21-q22 e é formado por cinco exons. Este gene codifica a proteína de ligação ciclosporina ou ciclofilina B (CyPB) localizada, principalmente, no retículo endoplasmático (VRANKA; SAKAI; BACHINGER, 2004; NCBI GENE, acesso em julho de 2014). Dentro do complexo P3H1-CRTAP-CyPB, atua principalmente como

uma PPIase, realizando a isomerização cis-trans das ligações peptidil-prolil nos domínios da tripla hélice que permite a formação de uma molécula estável (ISHIKAWA et al., 2009).

O complexo P3H1-CRTAP-CyPB é responsável pela 3-hidroxição de um único resíduo de prolina na posição 986 em cada uma das cadeias alfa 1 dos colágenos tipo I e II. Nos colágenos tipos III e IV, múltiplos resíduos de prolina são 3-hidroxiados (MARINI et al., 2007). A prolil-3-hidroxição é uma das várias modificações das cadeias de pró-colágeno que contribuem para o dobramento correto, para a estabilidade e secreção da molécula (CABRAL et al., 2007).

As moléculas de colágeno têm uma forte tendência formar agregados. Este processo deve ser inibido dentro das células e permitido apenas após a secreção no espaço extracelular. O complexo P3H1-CRTAP-CyPB, através de sua ligação às moléculas, contribui para a prevenção da agregação prematura das cadeias de colágeno no retículo endoplasmático. Com isso, verifica-se que o complexo P3H1-CRTAP-CyPB desempenha três funções: prolil-3-hidroxição, PPIase e chaperona molecular (ISHIKAWA et al., 2009).

Em humanos, mutações em *LEPRE1*, *CRTAP* e *PPIB* resultam em formas muito graves a letais de OI e estão associadas a uma excessiva modificação pós-traducional das cadeias do colágeno tipo I no retículo endoplasmático e a uma redução na 3-hidroxição do resíduo de prolina na posição 986 das cadeias alfa 1. (CABRAL et al., 2007; BALDRIDGE et al., 2008; BODIAN et al., 2009; WILLAERT et al., 2009; VAN DIJK et al., 2011; CHANG et al., 2010; PYOTT et al., 2011a; TAKAGI et al., 2012; CAPARRÓS-MARTIN et al., 2013; MOUL et al., 2013; ZHANG et al., 2011; MORELLO et al., 2006; BARNES et al., 2006; VAN DIJK et al., 2009a; VALLI et al., 2011; VAN DIJK et al., 2009b; BARNES et al., 2010; PYOTT et al., 2011b; BARNES et al., 2012). A ausência da P3H1, da CRTAP ou da CyPB resulta em um atraso no dobramento em hélice o que, conseqüentemente, expõe as cadeias da molécula à atividade das lisil hidroxilases e das prolil-4-hidroxilases por tempo prolongado. (CABRAL et al., 2007; VAN DIJK et al., 2009b).

De maneira geral, a OI é resultado de uma perturbação na atividade do complexo P3H1-CRTAP-CyPB, afetando não apenas a 3-hidroxição do resíduo de prolina na

posição 986 das cadeias alfa 1, como também a função de PPIase e de chaperona do complexo (VAN DIJK et al., 2009b).

2.5.2 *SERPINH1* E *FKBP10*

O gene *SERPINH1* [*serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)*, MIM 600943] é um gene formado por cinco exons e está localizado no cromossomo 11q13.5. Codifica a proteína 47 de choque térmico (HSP47), um membro da superfamília das serpinas de inibidores da proteinase da serina. Esta proteína localiza-se no retículo endoplasmático (NCBI GENE, acesso em julho de 2014).

O gene *FKBP10* (*FK506 binding protein 10, 65kDa*, MIM 607063) é formado por dez exons e está localizado no cromossomo 17q21.2. Codifica a FKBP65, uma isomerase cis-trans residente no retículo endoplasmático (ALANAY et al., 2010; NCBI GENE, acesso em julho de 2014).

Proteínas destinadas à secreção (como o colágeno tipo I) ou à incorporação a membranas entram no retículo endoplasmático co-traducionalmente, onde são montadas e dobradas em suas conformações ativas (NAGATA, 1996).

As moléculas de pró-colágeno tipo I são fracamente estáveis. Por esta razão, são submetidas à associação da HSP47 e da FKBP65, que atuam como chaperonas; estabilizam o pró-colágeno tipo I no retículo endoplasmático e auxiliam no seu dobramento, além de prevenirem a associação prematura das cadeias de pró-colágeno tipo I (ISHIKAWA et al., 2009). Como são transportadas juntamente com o pró-colágeno tipo I do retículo endoplasmático ao complexo de Golgi, a HSP47 e a FKBP65 também auxiliam na secreção do pró-colágeno tipo I (ALANAY et al., 2010).

HSP47 é uma proteína no retículo endoplasmático que se liga especificamente a vários tipos de colágeno e pró-colágeno e está envolvida no processamento e/ou na

secreção do colágeno sob condições normais. Em condições de estresse, HSP47 faz parte do sistema de controle de qualidade para o pró-colágeno, incluindo a prevenção da secreção da molécula com conformação anormal (NAGATA, 1996), sendo, assim, um fator crítico para a integridade final da tripla hélice do colágeno tipo I (CHRISTIANSEN et al., 2010). Apenas a molécula que se encontra na conformação correta de tripla hélice é transportada do retículo endoplasmático e secretada para fora das células pelo complexo de Golgi (NAGATA, 2003).

A FKBP65 está relacionada com vários processos celulares, sendo um deles a isomerização peptidil-prolil cis-trans (PPlase), além de desempenhar a função de chaperona (ALANAY et al., 2010).

A deficiência na atividade da HSP47 e da FKBP65 leva a um acúmulo do pró-colágeno tipo I dentro das células e a um atraso na secreção, sem alterações evidentes nos processos de síntese e modificação pós-traducional da molécula. (VENTURI et al., 2012a; ALANAY et al., 2010).

Em geral, mutações em outras chaperonas e enzimas modificadoras do colágeno tipo I, como CRTAP, P3H1 e CyPB, levam a uma excessiva modificação das cadeias do colágeno tipo I. Entretanto, mutações em *SERPINH1* e *FKBP10* não afetam a síntese e não resultam em cadeias de colágeno I excessivamente modificadas, indicando que os produtos destes genes interagem com as moléculas de pró-colágeno em estágios tardios da sua biossíntese, afetando a secreção das moléculas para a matriz extracelular (CHRISTIANSEN et al., 2010; ALANAY et al., 2010; KELLEY et al., 2011; SHAHEEN et al., 2011; VENTURI et al., 2012a; SCHWARZE et al., 2013).

2.5.3 *SERPINF1*

O gene *SERPINF1* [*serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1*, MIM 172860] localiza-se no cromossomo 17p13.3 e é constituído de oito exons (NCBI GENE, acesso em julho de 2014).

SERPINF1 codifica a proteína PEDF (**P**igment **E**pithelium-**D**erived **F**actor), uma glicoproteína de 418 aminoácidos, membro da superfamília das serpinas, amplamente expressa em cérebro, cordão espinhal, plasma, pulmões, olhos, coração e ossos (TUCKER et al., 2012).

Até o momento, mais de 1500 membros da família das serpinas já foram identificados, dos quais 36 são proteínas humanas. Esta família compreende dois grupos de proteínas. O primeiro grupo corresponde aos inibidores de proteases que regulam processos como inflamação, coagulação sanguínea e remodelação da matriz extracelular. O segundo grupo, do qual a PEDF faz parte, é formado por proteínas não inibidoras que desempenham diversas funções como transporte de hormônios, chaperonas moleculares ou supressão de tumores (FILLEUR et al., 2009).

A PEDF foi originalmente isolada do meio condicionado de cultura primária de células epiteliais da retina de fetos humanos (TOMBRAN-TINK; BARNSTABLE, 2004). Esta proteína apresenta uma série de propriedades biológicas: promove o desenvolvimento, a diferenciação e a sobrevivência neuronais; desempenha papel regulatório no ciclo celular e na senescência de fibroblastos em cultura. PEDF é, ainda, um potente inibidor da angiogênese, devido à supressão da migração e da proliferação celular endotelial e à indução da apoptose das células endoteliais (QUAN et al., 2005).

Sua potente atividade antiangiogênica combina-se com a atividade pró-angiogênica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - vascular endothelial growth factor), um processo crucial para a formação e a reabsorção ósseas. Enquanto a PEDF induz a diferenciação de precursores celulares em osteoblastos maduros, a

VEGF facilita a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea (VENTURI et al., 2012b).

A PEDF tem alta afinidade com colágenos da matriz extracelular (VENTURI et al., 2012b). Em ossos, regula a osteoprotegerina, que inibe a maturação dos osteoclastos e bloqueia precursores de proliferação e diferenciação dessas células. Assim, mutações com perda de função em *SERPINF1* levam a uma redução nos níveis de osteoprotegerina, que podem resultar no aumento do número de osteoclastos, e conseqüentemente, no aumento da reabsorção óssea (AKIYAMA et al., 2010; HOMAN et al., 2011).

Até o momento, não foram descritas mutações para a OI em *SERPINF1* que afetassem a síntese, as modificações pós-traducionais e a secreção do colágeno tipo I (HOMAN et al., 2011; VENTURI et al., 2012b; RAUCH et al., 2012; TUCKER et al., 2012; CHO et al., 2013).

No que se refere ao diagnóstico da OI tipo VI, a avaliação das concentrações séricas de PEDF mostrou-se ser um teste indicador mais eficiente do que a análise da sequência de todos os exons e dos limites exons/introns de *SERPINF1* (RAUCH et al., 2012).

2.6 OS ASPECTOS GENÉTICOS DA OI E AS CORRELAÇÕES ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO

Em 1983, a primeira mutação para a OI, uma deleção no gene *COL1A1*, foi descrita em um paciente com OI tipo II (CHU et al., 1983). No ano seguinte, descreveu-se a primeira mutação em *COL1A2* (PIHLAJANIEMI et al., 1984). Atualmente, já foram descritas mais de 1200 mutações diferentes nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, que afetam o colágeno tipo I (DALGLEISH, 1998), refletindo uma grande heterogeneidade genética da OI.

Até o momento, já foram descritas cerca de 1.500 mutações diferentes para OI, sendo que mais de 1.250 são mutações autossômicas dominantes nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, codificadores das cadeias de pró-colágeno alfa 1 e 2, respectivamente. Quase 200 mutações autossômicas recessivas foram descritas, das quais mais de 50% estão localizadas em um dos genes do complexo P3H1-CRTAP-CyPB (*LEPRE1*, *CRTAP* e *PPIB*) (DALGLEISH, 1998).

Existem duas classes gerais de mutações nos genes formadores das moléculas do colágeno tipo I: as que provocam uma diminuição da produção do colágeno tipo I, por geração de alelos nulos, e as que alteram a estrutura da molécula, devido à produção de cadeias pró-alfa 1 ou pró-alfa 2 anormais (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2002).

- Um alelo nulo é gerado devido a mutações que criam códons de parada prematuros em uma das fitas de DNA. Neste caso, apenas metade das moléculas de colágeno tipo I é produzida. Apesar dessa diminuição dos níveis de produção, todas as moléculas sintetizadas são normais;

- Quando um dos alelos de gene *COL1A1* está mutado, 75% das moléculas de colágeno tipo I sintetizadas são anormais, uma vez que este gene codifica as duas cadeias pró- α 1 da molécula. Em contrapartida, quando um dos alelos do gene *COL1A2* sofre mutação, 50% das moléculas de colágeno tipo I sintetizadas são anormais.

As proteínas compostas por subunidades, como o colágeno tipo I, em geral são sujeitas a mutações que evitam a associação das subunidades, alterando suas interfaces. Defeitos genéticos humanos envolvendo o colágeno tipo I ilustram a relação estreita entre a sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional desta proteína (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

No que se refere a mutações envolvendo o colágeno tipo I, o fenótipo reflete a natureza, o local e o efeito da mutação na cadeia. Em substituições de glicina, a natureza do aminoácido substituto define o fenótipo (BYERS, 2000).

De maneira geral, defeitos qualitativos são mais graves que defeitos quantitativos. Assim, a forma mais leve da doença (OI tipo I) está associada a mutações que

provocam defeitos quantitativos, ou seja, defeitos que causam a redução da produção do colágeno tipo I normal, por efeito do alelo nulo mutado (REDFORD-BADWAL et al., 1996). As formas mais graves de OI parecem ser causadas por mutações que provocam defeitos qualitativos, como substituições de glicina, perda de exons, rearranjos, deleções e inserções, resultando na produção de moléculas anormais de colágeno tipo I (FORLINO; MARINI, 2000).

Substituições de aminoácidos, deleções de exons ou pequenas deleções/inserções *in-frame* nos domínios de tripla hélice podem não interferir na associação das cadeias, mas levam a um atraso na propagação do dobramento. As moléculas permanecem ligadas a enzimas modificadoras e sua taxa de secreção torna-se bastante reduzida. Ao permanecerem por longos períodos no retículo endoplasmático, muitas moléculas são degradadas. Um pequeno número consegue continuar na via secretora, apesar de todos os mecanismos de checagem e retenção de moléculas anormais, e, ao serem secretadas, interferem na formação das fibrilas ou na mineralização. Mutações que levam a quadros como este resultam em fenótipos mais graves (BYERS, 2000).

Na figura 3, estão esquematizados os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento das formas dominantes de OI.

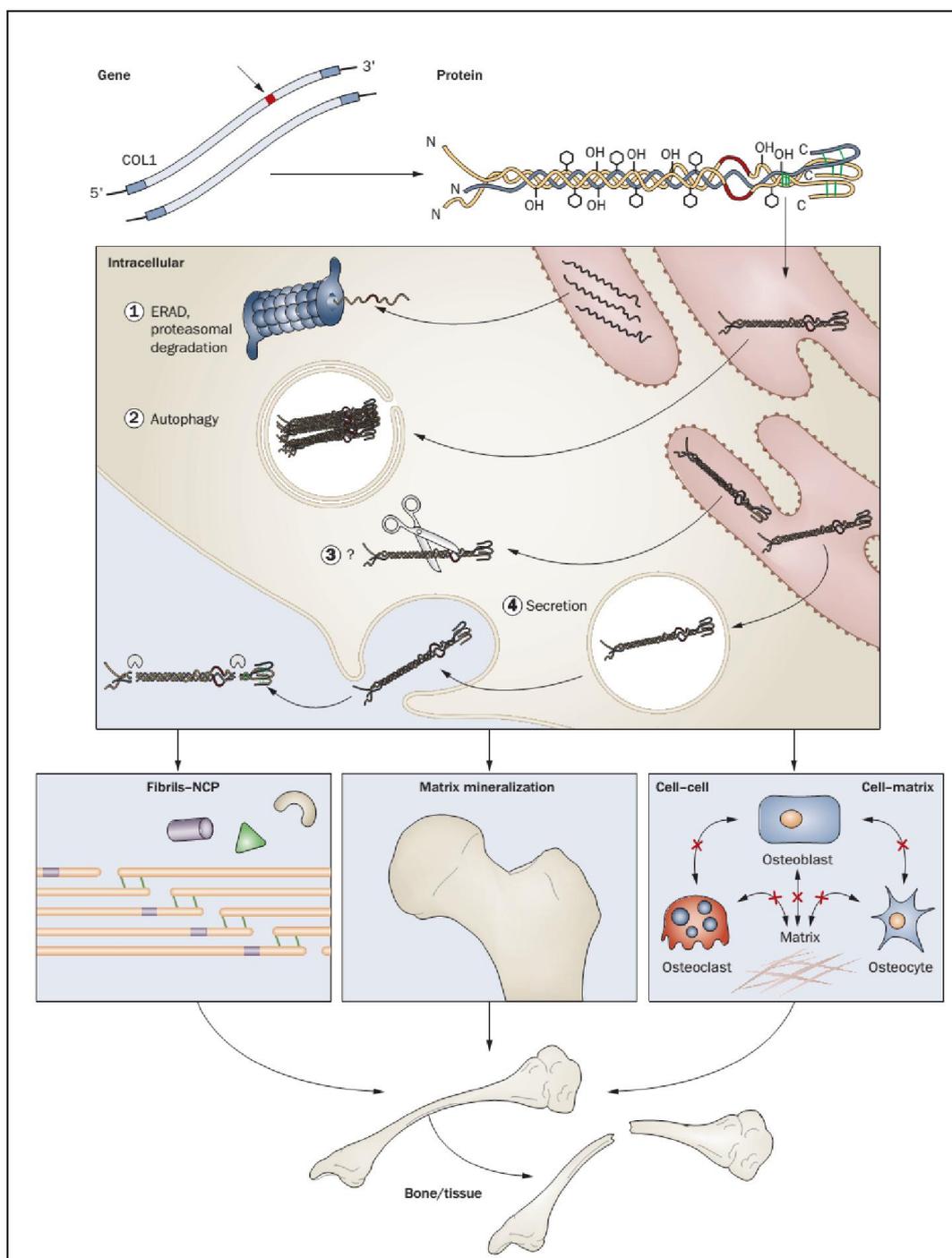


Figura 3 – Mecanismos que contribuem para a OI dominante: do colágeno tipo I mutante ao defeito no osso. Mutações em *COL1A1* ou *COL1A2* são traduzidas em cadeias de colágeno com estrutura anormal, que atrasam o dobramento do heterotrímero e resultam em excessivas modificações pós-traducionais na região da hélice do colágeno. Cadeias de pró-colágeno mutantes incapazes de formar heterotrímeros retornam ao citosol e são degradadas (1); heterotrímeros com defeitos estruturais formam agregados moleculares que são eliminados por autofagia (2); moléculas com mutações na tripla hélice são degradadas por uma via não identificada (3); pró-colágeno anormal

pode ser secretado, processado e incorporado à matriz extracelular (4). O colágeno mutante secretado afeta a estrutura da fibrila e as interações com outras proteínas na matriz, assim como a mineralização, o desenvolvimento dos osteoblastos e as ligações célula-célula e célula-matriz. O resultado geral é a deformidade e a fragilidade óssea. Adaptado de FORLINO et al., 2011.

2.7 ESTUDOS E ESTRATÉGIAS MOLECULARES DE DETECÇÃO DE MUTAÇÕES CAUSADORAS DA OI

O diagnóstico para a OI é dado analisando-se aspectos clínicos e radiológicos. Entretanto, o diagnóstico clínico, apenas, pode não ser tão preciso. A presença de esclera azulada, por exemplo, é uma característica altamente sugestiva, mas não é necessariamente um sintoma patognomônico de OI. A dentinogênese imperfeita é mais frequentemente observada na primeira dentição do que na dentição permanente (GLORIEUX, 2008).

Assim, existe uma demanda crescente para os estudos moleculares, objetivando a identificação das mutações causadoras da doença nos pacientes. Com esses estudos, é possível obter um melhor esclarecimento da relação entre genótipo e fenótipo, além de um diagnóstico precoce e mais preciso, imprescindível para um tratamento adequado, possibilitando uma melhor qualidade de vida aos pacientes portadores desta doença (HOROVITZ; MATTOS; LLERENA, 2004).

Análises moleculares fornecem informações úteis e auxiliam no aconselhamento genético. É importante ressaltar, porém, que um resultado positivo confirma a doença, mas um resultado negativo pode significar tanto que o paciente não é portador da OI, ou a mutação está presente e não foi detectada, ou a mutação não está presente nas regiões analisadas (GLORIEUX, 2008).

Várias técnicas de análises moleculares são utilizadas atualmente para detecção de mutações causadoras da OI. Entre elas, são frequentemente usadas as seguintes: reação em cadeia da polimerase (**PCR** – ***P**olymerase **C**hain **R**eaction*), triagem de mutações por SSCP (***S**ingle **S**trand **C**onformation **P**olymorphism*) e sequenciamento.

A técnica de PCR consiste na amplificação *in vitro* de um fragmento de interesse em milhões de cópias, utilizando pequenos fragmentos de DNA, os *primers*, que delimitarão as extremidades do fragmento a ser amplificado (SEPP, 1994; SAMBROOK; RUSSEL, 2011).

A técnica de SSCP é uma técnica de triagem de mutações. Trata-se de um método comparativo baseado na mobilidade eletroforética diferencial de um fragmento de DNA em fita simples em géis não denaturantes, em função não apenas do comprimento das cadeias de DNA, mas também da conformação, ditada pela sequência de nucleotídeos (STRACHAN; READ, 2002). O método foi inicialmente descrito por Orita e colaboradores (1989), mas estudos posteriores sugeriram modificações para melhorar a eficiência da técnica (SPINARDI; MAZARS; THELLET, 1991).

Uma das maiores vantagens do SSCP como técnica de triagem é que muitos produtos de PCR podem ser analisados simultaneamente. Além disso, muitos pesquisadores usam esta técnica para reduzir o número de amostras que deverão ser sequenciadas, realizando o sequenciamento apenas das amostras que se apresentarem alteradas no gel.

A sensibilidade da técnica é geralmente inversamente proporcional ao tamanho do fragmento. Para fragmentos entre 100 e 300 pares de base a sensibilidade é de cerca de 99%, sendo esta de 80% para fragmentos de 400 pares de bases (SUNNUCKS et al., 2000).

O sequenciamento de DNA é um processo que determina a ordem dos nucleotídeos de uma determinada amostra. Assim sendo, através do sequenciamento, é possível verificar a presença, o local e o tipo de alteração presente na amostra sequenciada. Por essas razões, o sequenciamento é uma poderosa ferramenta na detecção de mutações causadoras de doenças, sendo amplamente utilizada nos estudos de OI.

Os estudos moleculares são ferramentas muito úteis no que se refere a OI. Através da identificação de mutações em pacientes dos quais já foram obtidas as informações sobre os fenótipos, obtém-se um melhor esclarecimento sobre a relação entre os locais e tipos de mutações e os fenótipos decorrentes dessas alterações. A detecção de mutações causadoras da doença, bem como a

identificação da presença de polimorfismos não patogênicos dentro da população são peças imprescindíveis para um melhor aconselhamento genético sobre a OI e para otimizar o diagnóstico molecular.

3 PACIENTES E METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS

O Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), localizado em Vitória, ES, é considerado um centro de referência em OI, concentrando um número considerável de pacientes portadores desta rara doença. Assim, estimou-se uma amostra de 20 a 30 pacientes não aparentados para a realização deste trabalho. Os pacientes, atendidos no HINSG, foram analisados clínica e radiologicamente e diagnosticados como portadores de OI pela equipe médica responsável do hospital: Dr. Valentim Sipolatti, Dra. Maria Regina Galveias Oliveira Rebouças e Dra. Vanda Regina Rangel Nunes.

Foram coletados 2 – 5mL de sangue periférico dos pacientes para ser extraído o DNA. O tipo II é uma forma com morte perinatal. Dessa forma, para a coleta de material biológico de pacientes portadores desse tipo de OI são necessários recursos que não estavam disponíveis para a realização do presente estudo.

Foram, também, coletados 5mL de sangue de 100 indivíduos da população local, não afetados pela OI, sem grau de parentesco entre si e com os pacientes estudados, que foram utilizados como controles e foram analisados no estudo de possíveis polimorfismos.

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo EDTA 5% (200µL para cada 5mL de sangue). A coleta de sangue dos pacientes com OI, que consentiram em participar do trabalho, foi realizada no HINSG e a coleta de amostras dos controles normais foi realizada no Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Todos os pacientes com OI no HINSG foram convidados a participar da pesquisa e receberam, junto aos pais/responsáveis, esclarecimentos sobre os procedimentos, riscos e benefícios do trabalho. Aqueles que consentiram em participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre esclarecido.

A identidade de todos os pacientes foi preservada e todos os dados e materiais biológicos coletados estão sob responsabilidade da pesquisadora responsável, Prof^a. Dra. Flavia de Paula.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (protocolo nº. 12/010).

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA total foi extraído a partir de 2 - 5mL de sangue periférico baseando-se na metodologia descrita por Miller e colaboradores (1988), modificada como a seguir:

- a) Transferir o sangue para um tubo de polipropileno;
- b) Completar o volume para 13mL com solução de lise (NH_4Cl 1550mM; KHCO_3 100mM; EDTA 10mM pH 7,4), homogeneizando em seguida;
- c) Manter o tubo no gelo por, pelo menos, 30 minutos, para a obtenção da lise da membrana celular;
- d) Centrifugar por 15 minutos a 1.800 rotações por minuto (rpm);
- e) Desprezar o sobrenadante e lavar o precipitado em 5mL de solução de lise;
- f) Centrifugar por 5 minutos a 1.800 rpm;
- g) Desprezar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 1,5mL de solução de lise de membrana nuclear (Tris-HCl 100mM pH8,0; NaCl 4M; EDTA 20mM pH8,2);
- h) Adicionar 35 μL de proteinase K na concentração de 10mg/mL e 200 μL de SDS 10%;

- i) Homogeneizar levemente e incubar os tubos a 37°C por um período de 24 horas;
- j) Após a incubação, adicionar 0,5mL de NaCl 6M e agitar o tubo vigorosamente;
- k) Centrifugar por 20 minutos a 2.500 rpm;
- l) Transferir o sobrenadante para um tubo de polipropileno limpo;
- m) Centrifugar por 15 minutos a 2.500 rpm;
- n) Transferir o sobrenadante para um tubo de vidro;
- o) Precipitar o DNA, adicionando-se duas vezes o volume de etanol absoluto e invertendo o tubo de vidro vagarosamente;
- p) Coletar o DNA com auxílio de um capilar de vidro com a extremidade soldada;
- q) Lavar o DNA preso no capilar de vidro em etanol 70%;
- r) Colocar o DNA preso no capilar de vidro em um tubo de microcentrifuga seco e devidamente identificado;
- s) Dissolver o DNA no tubo acrescentando 200µL de solução de TE⁻⁴ (10mM Tris-HCl pH 8,0; 100µM EDTA pH7,4) e desprezar o capilar de vidro;
- t) Incubar a 65°C por 30 minutos, para minimizar a contaminação por DNase;
- u) Armazenar as amostras em geladeira própria a 4°C.

3.3 CHECAGEM DO DNA EXTRAÍDO

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro *Thermo Scientific NanoDrop™ 1000®* e diluído para a concentração de uso (20ng/μL) com água ultrapura.

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR - *Polymerase Chain Reaction*)

Todos os exons dos genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* e *SERPINF1* foram amplificados por PCR em um termociclador *Applied Biosystems (GeneAmp®PCR System 9700)*, utilizado-se *primers* descritos Baldrige e colaboradores (2008) e *primers* desenhados pela própria equipe executora da pesquisa, utilizando o programa Primer 3 Input (versão 0.4.0), disponível online.

Cada par de *primers* amplifica um fragmento composto pelo exon, pelos limites exon/intron e por porções dos introns. Alguns exons dos genes estudados são muito longos, gerando fragmentos de tamanhos maiores do que o recomendado para serem analisados com as técnicas adotadas neste trabalho (HAYASHI, 1991; HAYASHI; YANDELL, 1993; SHEFFIELD et al., 1993; SUNNUCKS et al., 2000). Para esses casos, foram desenhados dois ou mais pares de *primers* por exon, possibilitando uma análise mais confiável do mesmo. Os *primers* utilizados neste estudo estão descritos nos Quadros 3-8.

Após cada reação de amplificação, os produtos foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% [7,5 mL de acrilamida 40%, 5mL de TBE 10X, 325μL de persulfato de amônio (APS) 10%, 35μL de TEMED e água destilada para o volume final de 50mL] para verificar o resultado da PCR. Cerca de 6μL de produto de PCR de cada amostra foram misturados com 2μL de corante e aplicados no gel.

Quadro 3 – *Primers* utilizados na amplificação dos fragmentos do gene *LEPRE1*

EXON	EXTENSÃO DO FRAGMENTO (PB)	PRIMER	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'-3')
1a	378	<i>Forward</i>	GGGCTGACTGAAAGGAAAAG
		<i>Reverse</i>	AGCGCAGGCGAAGGGCGC
1b	359	<i>Forward</i>	GGTCCTGAGCATGGAACG
		<i>Reverse</i>	CAACACTCCTCTCCCCAGAA
2*	389	<i>Forward</i>	CTCAGGGAGGCAGGGATT
		<i>Reverse</i>	AGTCCGGGAATTTGAGGTTA C
3*	390	<i>Forward</i>	CCCCTTTCCATCCATAACC
		<i>Reverse</i>	GAGTCCCCATTTATATTATCA
4	378	<i>Forward</i>	GGGACTCTTCACCCTCATT
		<i>Reverse</i>	AAGCCAAACACCTTGAGGAA
5	297	<i>Forward</i>	GGTCCCTGGTGCTAGGATTT
		<i>Reverse</i>	GCCTACTCCCCTCTGCTACC
6	347	<i>Forward</i>	CTGGGGAACAGACAGAGAGC
		<i>Reverse</i>	CTCAGCCTCCAGCAAGTTTT
7*	239	<i>Forward</i>	GGCAGCTAGAAGGGACTTAGA
		<i>Reverse</i>	ATGCAGTTTCTTCAAGGTCCTC
8	394	<i>Forward</i>	AAGCACTTGAGGCTTCCTGA
		<i>Reverse</i>	TCCACTGAACTTGCACCCTA
9*	359	<i>Forward</i>	AAAATGACCTAGCGGGAGA
		<i>Reverse</i>	GGAAGAGGAAGGCGAAGGCTAC
10*	347	<i>Forward</i>	GTGGTAGCCTTCGCCTTC
		<i>Reverse</i>	AACATAACTCATCCTCGCTTCC
11	378	<i>Forward</i>	AGGTCCCTTCCACAACACAT
		<i>Reverse</i>	ACATTGGTTCCCCAACTGAA
12	332	<i>Forward</i>	CATTGGGCATTCCGTAGACT
		<i>Reverse</i>	CCAGTGTGTGTGTGCTAGGG
13	300	<i>Forward</i>	CACACAAAGCCACCCTCCT
		<i>Reverse</i>	CAAGGGTACCGCCCACTG
14	388	<i>Forward</i>	GGGAAGCCATACTGAAGAGC
		<i>Reverse</i>	GTGTCCCAAGTGCTCCTTTC
15A	384	<i>Forward</i>	CCTGGGAAGTAGCAGCTGAG
		<i>Reverse</i>	GCACCATGTAGAAGGCTGTG
15B	348	<i>Forward</i>	TGACTAGACCCATGGAGAGGA
		<i>Reverse</i>	AGACCTCTGGGACAGAATGG

*Os *primers* que amplificam os exons 2, 3, 7, 9 e 10 foram descritos por Baldrige e colaboradores (2008). Os demais *primers* foram desenhados pela equipe executora da pesquisa.

Quadro 4 – *Primers* utilizados na amplificação dos fragmentos do gene *CRTAP*

EXON	EXTENSÃO DO FRAGMENTO (PB)	PRIMER	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'-3')
1A	399	<i>Forward</i>	CAGCTGGCGCCAGATCCCC
		<i>Reverse</i>	GCAGCCGCAGGCTGATCTCC
1B	391	<i>Forward</i>	GCCGAGAGCGTGGGCTACCT
		<i>Reverse</i>	GAAGTGGAGGGGCAACGCGG
2	392	<i>Forward</i>	CCTGGAAGTCATGGAACCTT
		<i>Reverse</i>	GCAGCTGCTTATGGAGAGAC
3	333	<i>Forward</i>	TGGTCTTGGTTCCCTTTGA
		<i>Reverse</i>	AGGCATGCAGGCAGAAAC
4	310	<i>Forward</i>	CTTTTTCATTTGGGCAGGAC
		<i>Reverse</i>	TGAACTCTCAACAACCGTAGC
5	294	<i>Forward</i>	TGGCCTTTTTGTTAGAAGC
		<i>Reverse</i>	AAGGCACGAGGTAGTCTCCA
6	240	<i>Forward</i>	CCTCCCTCCTCCCAGTTCTA
		<i>Reverse</i>	AGGACTCAGCCTTCCAGTGA
7	238	<i>Forward</i>	TGATGGCCTCTCGGGATA
		<i>Reverse</i>	GGCTCTGAGGTATCAACAGC

Quadro 5 – *Primers* utilizados na amplificação dos fragmentos do gene *PPIB*

EXON	EXTENSÃO DO FRAGMENTO (PB)	PRIMER	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'-3')
1	259	<i>Forward</i>	CTCCGGCCTCAGCTGTC
		<i>Reverse</i>	AGGAGGGGCTCAGCCAAG
2	283	<i>Forward</i>	TCTCCATCCTCAGTTAGC
		<i>Reverse</i>	CTCTGCAGGTCAGTTTGCTG
3	293	<i>Forward</i>	CGAGCAGGAGTTGTGGACTT
		<i>Reverse</i>	GAGCTGGGGAAGAAAGAGG
4	314	<i>Forward</i>	CGAATGTCTGCTTGTTTGG
		<i>Reverse</i>	AATCCCCGGTGAGGATTG
5	306	<i>Forward</i>	TTCTCCTGAGCGGTGGAC
		<i>Reverse</i>	CTCCACCAGATGCCAGCAC

Quadro 6 – *Primers* utilizados na amplificação dos fragmentos do gene *FKBP10*

EXON	EXTENSÃO DO FRAGMENTO (PB)	PRIMER	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'-3')
1	400	<i>Forward</i>	ACCAGCCAGGGCGGGGGT
		<i>Reverse</i>	AATCCGGGGGCGCCCAACC
2	285	<i>Forward</i>	TGCATCTGTGCCACCATGGGC
		<i>Reverse</i>	ACCCCAGGATCCCTGATTCTGCC
3	376	<i>Forward</i>	GGTGCTGGGATGAGAGGAAGGGG
		<i>Reverse</i>	TGGAGGTGGGAGAGGCAGGC
4	285	<i>Forward</i>	GCATGGGGAGCGGGAATCCG
		<i>Reverse</i>	ACCTGAGCAACTGTATGTGGAGGC
5	397	<i>Forward</i>	GCTGATGGGCGGGAAAGGGC
		<i>Reverse</i>	AGGCAGCTCAGAGTGACCCCC
6	300	<i>Forward</i>	CTGCCTGGAAGGGGAGGGC
		<i>Reverse</i>	GCGGTGCCTGGAATCCCACT
7	392	<i>Forward</i>	CCTCAGGGTCGGGAAGGGGT
		<i>Reverse</i>	AGAGGGAGGAGCAGGCCTCG
8	386	<i>Forward</i>	CTGGGCCACCTCAGAGGGA
		<i>Reverse</i>	ACTCGGGAGGCTGAGGCAGG
9	337	<i>Forward</i>	AACTGGCCTGTGGGCTGGGA
		<i>Reverse</i>	CCGACGGGGGACGTCTTCT
10A	393	<i>Forward</i>	CCATGACCCTCACTGCCCGC
		<i>Reverse</i>	AGGGTGGTGGGAACACCAGAGA
10B	394	<i>Forward</i>	GGATGAGGTCCAGGAGCCAACT
		<i>Reverse</i>	CTGCCCTCCAGGAGCCTTCCC
10C	395	<i>Forward</i>	TGACTGGCTCCTAGGGAAGGGGA
		<i>Reverse</i>	CCCCCTGCCCTCAACCTGG

Quadro 7 – Primers utilizados na amplificação dos fragmentos do gene *SERPINH1*

EXON	EXTENSÃO DO FRAGMENTO (PB)	PRIMER	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'-3')
1	400	<i>Forward</i>	TCGCACTCTGAAGGACACGCT
		<i>Reverse</i>	CGCACCCCCAGATTGCTCGG
2A	299	<i>Forward</i>	AGCTGAGGGTGGTTGTTGGGG
		<i>Reverse</i>	TCTCCACTGCCTGGTCCTTGG
2B	300	<i>Forward</i>	CGGCCTGGCCTTCAGCTTGT
		<i>Reverse</i>	CGCACGAAGTCATCAGCGAAGC
2C	300	<i>Forward</i>	CTGGAAGCTGGGCAGCCGAC
		<i>Reverse</i>	ACTCTTGCAGGGGGTCTGG
3	249	<i>Forward</i>	GGGGTGGCTGTGGGCTGTGA
		<i>Reverse</i>	TGTGTGCAGGGGTGGGTCAGA
4	397	<i>Forward</i>	GTGGGTGGGGGTCCAAGGGT
		<i>Reverse</i>	ACCTGCTGAATTGGTGAGTGGGT
5A	317	<i>Forward</i>	TGGGGTGGAGGGTTTGAGGGT
		<i>Reverse</i>	GGGAGCCGCTTTGGGTGTCC
5B	293	<i>Forward</i>	GCGCAGCCCCAAGCTGTTCT
		<i>Reverse</i>	TGGGAAGGTCCGCTCAGGCA
5C	369	<i>Forward</i>	ACTCCATGGGGTGGGGGTGG
		<i>Reverse</i>	TTCTGGGGGTGCCTGGTCCC
5D	386	<i>Forward</i>	TCAGCTGCCTCCCCAGCTCT
		<i>Reverse</i>	AGGAGACCTTGTCCCCTGGGAAG

Quadro 8 – *Primers* utilizados na amplificação dos fragmentos do gene *SERPINF1*

EXON	EXTENSÃO DO FRAGMENTO (PB)	PRIMER	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'-3')
1	369	<i>Forward</i>	GCCCGGCCCTGAAGGAAAA
		<i>Reverse</i>	CCTGCCTCTCCCCTGTCCCC
2	299	<i>Forward</i>	CTGCCCAACCCCTGGGTCCT
		<i>Reverse</i>	CAAGCCTGGCCTGGAACCTG
3	384	<i>Forward</i>	ACAGCCCAAGGGCCAGAA
		<i>Reverse</i>	TCAGCCACGTTTACGCAGAGGC
4	347	<i>Forward</i>	TGTCTGTGTTCTGGGAGGGGGC
		<i>Reverse</i>	CCAGCCTGGGCAACAGAGCG
5	399	<i>Forward</i>	ACCAGAACCCGAGCCTGGCA
		<i>Reverse</i>	AGATCGCACCACTGCACTCCA
6	291	<i>Forward</i>	TCTGGGGACACAGCATGGCG
		<i>Reverse</i>	ATTCCCACTACCCTGTTTTGCTTCTC
7	399	<i>Forward</i>	CACGGGAGAGGGAAGGCAGC
		<i>Reverse</i>	GCCTGTGGAGCCCTTGCGTT
8A	353	<i>Forward</i>	ACAGTGCTGCGCCATCCCAG
		<i>Reverse</i>	GGCCCTGGGGTCCAGAATC
8B	293	<i>Forward</i>	TTCGTA CTGAGGGACACAGACACA
		<i>Reverse</i>	ACCAGGCTAGAAGTAGAGGACCACCA

Após a corrida por cerca de uma hora e meia a 240V, o gel foi corado com nitrato de prata.

Nos géis de poliacrilamida, o objetivo final foi a verificação de uma única banda do tamanho esperado, quando comparada com um marcador molecular de tamanho conhecido também aplicado nos géis. As condições de amplificação foram testadas e padronizadas para cada par de primers / fragmento analisado.

3.5 TRIAGEM DE MUTAÇÕES

Após a amplificação por PCR, realizou-se a triagem de mutações nas amostras pela técnica de *Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*, descrita por Orita e colaboradores (1989). A técnica de SSCP é um método comparativo baseado na mobilidade eletroforética diferencial de um fragmento de DNA em fita simples em géis não denaturantes, em função não apenas do comprimento das cadeias de DNA, mas também da conformação, ditada pela sequência de nucleotídeos.

Para a triagem de mutações, foi utilizado o gel de poliacrilamida 5% com adição de 5% de glicerol (SPINARDI; MAZARS; THELLET; 1991) e TBE 0,5X (8,75mL de poliacrilamida 40%, 3,5 mL de TBE 10X, 3,5 mL de glicerol, 600 μ L de APS 10%, 30 μ L de TEMED e água destilada até o volume de 70mL). Além disso, também foram utilizados outros dois géis: o gel de poliacrilamida 7% (12,25mL de poliacrilamida 40%) e uma fórmula comercial de poliacrilamida, o gel de MDE da marca *Cambrex Bio Science Rockland, Inc* (13,75mL de MDE, 3,3mL de TBE 10X, 1,37mL de glicerol, água destilada até o volume de 55mL, 220 μ L de APS 10% e 22 μ L de TEMED), que é mais sensível, de acordo com o fabricante, facilitando a observação de bandas.

Cerca de 10 μ L de cada produto de PCR foram misturados com 2 μ L de corante *SSCP-loading buffer* (980 mL/L formamida, 10 mmol/L EDTA, 0,25 g/L xileno cianol FF, e 0,25 g/L bromofenol *blue*). As amostras, já misturadas com o corante, foram desnaturadas a 94°C por 10 minutos, mantidas no gelo e aplicadas nos géis. Os géis foram submetidos à eletroforese à 6-8W por 9 -17 horas (gel de poliacrilamida 5%) ou por 17-32 horas (géis de poliacrilamida 7% e de MDE), a uma temperatura aproximada de 18°C. Após a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata.

3.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE ALTERAÇÕES

Os fragmentos com migração anormal no gel foram sequenciados no laboratório do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As análises e a denominação das alterações foram realizadas baseando-se nas sequências referências para os genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* e *SERPINF1* (NG_008123.1, NG_008122.1, NG_012979.1, NG_015860.1, NG_012052.1 e NG_028180.1, respectivamente) e comparadas com as alterações já descritas no banco de dados '*The Human Type I Collagen Mutation Database*' (DALGLEISH, 1998).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar mutações nos genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* e *SERPINF1* causadoras da Osteogênese Imperfeita em pacientes atendidos no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória (HINSG), em Vitória, Espírito Santo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a triagem de mutações em todos os exons e limites exons/introns dos genes *LEPRE1*, *CRTAP*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1* e *SERPINF1* em pacientes com Osteogênese Imperfeita;
- b) Sequenciar as amostras alteradas e determinar os tipos de variações genéticas encontradas nos fragmentos em questão;
- c) Investigar em controles normais as alterações encontradas em pacientes para avaliar a ocorrência de polimorfismos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKCAY, T. et al. Alendronate Treatment in Children with Osteogenesis Imperfecta. **Indian Pediatr**, v. 45, p. 105-109, 2008.

AKIYAMA, T. et al. PEDF regulates osteoclasts via osteoprotegerin and RANKL. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 391, p. 789-794, 2010.

ALANAY, Y. et al. Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive Osteogenesis Imperfecta. **Am J Hum Genet**, v. 86, p. 551-559, 2010.

BALDRIDGE, D. et al. CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive Osteogenesis Imperfecta. **Hum Mutat**, v. 29, p. 1435-1442, 2008.

BALJET, B. Aspects of the history of Osteogenesis Imperfecta (Vrolik's syndrome). **Ann Anat**, v. 194, p. 1-7, 2002.

BARNES, A.M. et al. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal Osteogenesis Imperfecta. **New Engl J Med**, v. 355, p. 2757-2764, 2006.

BARNES, A.M. et al. Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfect with normal collagen folding. **N Engl J Med**, v. 362, p. 521-528, 2010.

BARNES, A.M. et al. Absence of *FKBP10* in recessive type XI Osteogenesis Imperfecta leads to diminished collagen cross-linking and reduced collagen deposition in extracellular matrix. **Hum Mutat**, v. 33, p. 1589-1598, 2012.

BARSH, G.S.; BYERS, P.H. Reduced secretion of structurally abnormal type I procollagen in a form of Osteogenesis Imperfecta. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 78, p. 5142-5146, 1981.

BECKER, J. et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in human *SERPINF1* in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. **Am J Hum Genet**, v. 88, p. 362-371, 2011.

BISHOP, N. Characterising and treating osteogenesis imperfecta. **Early Hum Dev**, v. 86, p. 743-746, 2010.

BODIAN, D.L. et al. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype–phenotype relationships. **Hum Mol Genet**, v. 18, p. 463-471, 2009.

BYERS, P.H. et al. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta (OI type II): a biochemically heterogeneous disorder usually due to new mutations in the genes for type I collagen. **Am J Hum Genet**, v. 42, p. 237-248, 1988.

BYERS, P.H. Collagens: building blocks at the end of the development line. **Clin Genet**, v. 58, p. 270-279, 2000.

CABRAL, W.A. et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic disorder resembling lethal/severe Osteogenesis Imperfecta. **Nat Genet**, v. 39, p. 359-365, 2007.

CANTY, E.G.; KADLER, K.E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. **J Cell Sci**, v. 118, p. 1341-1353, 2005.

CAPARRÓS-MARTIN, J.A. et al. Clinical and molecular analysis in families with autosomal recessive osteogenesis imperfecta identifies mutations in five genes and suggests genotype-phenotype correlations. **Am J Med Genet A**, v. 161A, p. 1354-1369, 2013.

CHANG, W. et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 and CRTAP are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex. **Hum Mol Genet**, v. 19, p. 223-234, 2010.

CHO, T.J. et al. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* causes osteogenesis imperfecta type V. **Am J Hum Genet**, v. 91, p. 343-348, 2012.

CHO, S.Y. et al. Osteogenesis Imperfecta type VI with severe bony deformities caused by novel compound heterozygous mutations in *SERPINF1*. **J Korean Med Sci**, v. 28, p. 1107-1110, 2013.

CHOI, J.W. et al. Severe Osteogenesis Imperfecta in Cyclophilin B-deficient mice. **PLoS Genet**, v. 5, 2009.

CHRISTIANSEN, H.E. et al. Homozygosity for a Missense Mutation in *SERPINH1*, which Encodes the Collagen Chaperone Protein HSP47, Results in Severe Recessive Osteogenesis Imperfecta. **Am J Hum Genet**, v. 86, p. 389-398, 2010.

CHU, M.L. et al. Internal deletion in a collagen gene in a perinatal lethal form of osteogenesis imperfecta. **Nature**, v. 304, p. 78-80, 1983.

DALGLEISH, R. The human collagen mutation database 1998. **Nucleic Acids Res**, v. 26, p. 253-255, 1998.

FAHIMINIYA, S. et al. Mutations in *WNT1* are a cause of osteogenesis imperfecta. **J Med Genet**, v. 50, p. 345-348, 2013.

FILLEUR, S. et al. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. **J Cell Biochem**, v. 106, p. 769-775, 2009.

FORLINO, A.; MARINI, J.C. Osteogenesis Imperfecta: Prospects for Molecular Therapeutics. **Mol Genet Metab**, v. 71, p. 225-232, 2000.

FORLINO, A. New perspectives on osteogenesis imperfecta. **Nat Rev Endocrinol**, v. 7, p. 540-557, 2011.

GAJKO-GALICKA, A. Mutations in type I collagen genes resulting in Osteogenesis Imperfecta in humans. **Acta Biochim Pol**, v. 49, p. 433-441, 2002.

GLORIEUX, F.H. et al. Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfect. **N Engl J Med**, v. 339, p. 947-952, 1998.

GLORIEUX, F.H. Osteogenesis Imperfecta. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 22, p. 85-100, 2008.

HAMMOND, C.; HELENIUS, A. Quality control in the secretory pathway. **Curr Opin Cell Biol**, v. 7, p. 523-529, 1995.

HAYASHI, K. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **PCR Methods and Applications**, v. 1, p. 34-38, 1991.

HAYASHI, K.; YANDELL, D. W. How sensitive is PCR-SSCP?. **Human Mutations**, v. 2, p. 338-346, 1993.

HOMAN, E.P. et al. Mutations in *SERPINF1* cause Osteogenesis Imperfecta type VI. **J Bone Miner Res**, v. 26, p. 2798-2803, 2011.

HOROVITZ, D.D.; de MATTOS, R.A.; LLERENA, J.C.Jr. Medical genetic services in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Community Genet**, v. 7, p. 111-116, 2004.

ISHIKAWA, Y. et al. Biochemical Characterization of the Prolyl 3-Hydroxylase 1*Cartilage-associated Protein*Cyclophilin B Complex. **J Biol Chem**, v. 284, p. 17641-17647, 2009.

KELLEY, B.P. et al. Mutations in *FKBP10* cause recessive osteogenesis imperfecta and Bruck Syndrome. **J Bone Miner Res**, v. 26, p. 666-672, 2011.

LAPUNZINA, P. et al. Identification of a Frameshift Mutation in *Osterix* in a Patient with Recessive Osteogenesis Imperfecta. **Am J Hum Genet**, v. 87, p. 110-114, 2010.

LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM. Princípios de Bioquímica. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LOWENSTEIN, E.J. Osteogenesis imperfecta in a 3,000-year-old mummy. **Childs Nerv Syst**, v. 25, p. 515-516, 2009.

LUND, A.M. et al. Parental mosaicism and autosomal dominant mutations causing structural abnormalities of collagen I are frequent in families with osteogenesis imperfecta type III/IV. **Acta Paediatr**, v. 86, p. 711-718, 1997.

MARINI, J.C.; BLISSETT, A.R. New Genes in Bone Development: What's New in Osteogenesis Imperfecta. **J Clin Endocrin Metab**, v. 98, p. 3095-3103, 2013.

MARINI, J.K. et al. Components of the collagen prolyl-3-hydroxylation complex are crucial for normal bone development. **Cell Cycle**, v. 6, p. 1675-1981, 2007.

MARTÍNEZ-GLEZ, V. et al. Identification of a Mutation Causing Deficient BMP1/mTLD Proteolytic Activity in Autosomal Recessive Osteogenesis Imperfecta. **Hum Mutat**, v. 33, p. 343-350, 2012.

MOFFATT, P. et al. Bril: A Novel Bone-Specific Modulator of Mineralization. **J Bone Miner Res**, v. 23, p. 1497-1508, 2008.

MOONEY, S.D.; KLEIN, T.E. Structural Models of Osteogenesis Imperfecta-associated variants in the *COL1A1* gene. **Mol Cell Proteomics**, v.1, p.868-875, 2002.

MORELLO, R. et al. *CRTAP* is required for prolyl 3-hydroxilation and mutations cause recessive Osteogenesis Imperfecta. **Cell**, v. 127, p. 291-304, 2006.

MOUL, A. et al. Osteogenesis imperfecta due to compound heterozygosity for the *LEPRE1* gene. **Fetal Pediatr Pathol**, v. 32, p. 319-325, 2013.

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

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

NAGATA, K. Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. **Trends Biochem Sci**, v. 21, p. 22-26, 1996.

NAGATA, K. HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development. **Semin Cell Dev Biol**, v. 14, p. 275-282, 2003.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - GENE. EUA. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>>. Acesso em setembro de 2014.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. Thompson & Thompson Genética Médica. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

ORITA, M. et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-stranded conformation polymorphisms. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 86, p. 2766-2770, 1989.

PIHLAJANIEMI, T. et al. Osteogenesis imperfecta: cloning of a pro-alpha 2(I) collagen gene with a frameshift mutation. **J Biol Chem**, v. 259, p. 12941-12944, 1984.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer 3 on the WWW for general users and for biologists programmers. In KRAWETZ, S.; MISENER, S. (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386.

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

PYOTT, S.M. et al. Recurrence of perinatal lethal osteogenesis imperfecta in sibships: parsing the risk between parental mosaicism for dominant mutations and autosomal recessive inheritance. **Genet Med**, v. 13, p. 125-130, 2011a.

PYOTT, S.M. et al. Mutations in *PPIB* (cyclophilin B) delay type I procollagen chain association and result in perinatal lethal to moderate osteogenesis imperfecta phenotypes. **Hum Mol Genet**, v. 20, p. 1595–1609, 2011b.

QUAN, G.M. et al. Localization of pigment epithelium-derived factor in growing mouse bone. **Calcif Tissue Int**, v, 76, p. 146-153, 2005.

RAUCH, F. Risedronate in the treatment of mild pediatric osteogenesis imperfecta: a randomized placebo-controlled study. **J Bone Miner Res**, v. 24, p. 1282-1289, 2009.

RAUCH, F. et al. Lack of circulating pigment epithelium-derived factor is a marker of osteogenesis imperfecta type VI. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, p. 1550-1556, 2012.

REDFORD-BADWAL, D.A. et al. Nuclear retention of COL1A1 messenger RNA identifies null alleles causing mild Osteogenesis Imperfecta. **J Clin Invest**, v. 97, p.1035-1040, 1996.

ROUGHLEY, P.H.; RAUCH, F.; GLORIEUX, F.H. Osteogenesis Imperfecta – Clinical and Molecular diversity. **Eur Cells Mater**, v. 5, p. 41-47, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SCHWARZE, U. et al. Mutations in *FKBP10*, which result in Bruck syndrome and recessive forms of osteogenesis imperfecta, inhibit the hydroxylation of telopeptide lysines in bone collagen. **Hum Mol Genet**, v. 22, p. 1-17, 2013.

SEMLER, O. et al. 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. **Am J Hum Genet**, v. 91, p. 349-357, 2012.

SEPP, R. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. **J Clin Pathol**, v. 47, p. 318-323, 1994.

SHAHEEN, R. et al. Mutations in *FKBP10* cause both Bruck Syndrome and isolated osteogenesis imperfecta in humans. **Am J Med Genet A**, v. 155A, p. 1448-1452, 2011.

SHAHEEN, R. et al. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfect in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. **J Med Genet**, v. 49, p. 630-635, 2012.

SHEFFIELD V. C.; BECK, J. S.; KWITEK, A. E. et al., The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. **Genomics**, v. 16, p. 325-332, 1993.

SILLENCE, D.O.; SENN, A.; DANKS, D.M. Genetic heterogeneity in Osteogenesis Imperfecta. **J Med Genet**, v. 16, p. 101-116, 1979.

SPINARDI, L.; MAZARS, R.; THELLET, C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 14, 1991.

STRACHAN, T.; READ, A.P. *Genética Molecular Humana*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

SUNNUCKS, P. et al. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Mol Ecol**, v. 9, p. 1699–1710, 2000.

SYMOENS, S. et al. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfecta in humans. **Orphanet J Rare Dis**, v. 8, p. 154-159, 2013.

TAKAGI, M. et al. A novel mutation in *LEPRE1* that eliminates only the KDEL ER-retrieval sequence causes non-lethal Osteogenesis Imperfecta. **PLoS One**, v. 7, 2012.

TAKAGI, M. et al. A recurrent mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* causes osteogenesis imperfecta type V. **Am J Med Genet A**, v. 161A, p. 1980-1982, 2013.

TOMBRAN-TINK, J.; BARNSTABLE, C.J. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, p. 573-579, 2004.

TUCKER, T. et al. A co-occurrence of osteogenesis imperfecta type VI and cystinosis. **Am J Med Genet A**, v. 158A, p. 1422-1426, 2012.

VALLI, M. et al. Deficiency of *CRTAP* in non-lethal recessive osteogenesis imperfecta reduces collagen deposition into matrix. **Clin Genet**, v. 82, p. 453-459, 2011.

VAN DIJK, F.S. et al. *PPIB* mutations cause severe Osteogenesis Imperfecta. **Am J Hum Genet**, v. 85, p. 521–527, 2009a.

VAN DIJK, F.S. et al. *CRTAP* mutations in lethal and severe osteogenesis imperfecta: the importance of combining biochemical and molecular genetic analysis. **Eur J Hum Genetics**, v. 17, p. 1560-1569, 2009b.

VAN DIJK, F. S. et al. Classification of Osteogenesis Imperfecta revisited. **Eur J Med Genet**, v. 53, p. 1-5, 2010.

VAN DIJK, F.S. et al. Lethal/severe osteogenesis imperfecta in a large family: a novel homozygous *LEPRE1* mutation and bone histological findings. **Pediatr Dev Pathol**, v. 14, p. 228-234, 2011.

VAN DIJK, F.S.; SILLENCE, D.O. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis,

nomenclature and severity assessment. **Am J Med Genet A**, v. 164A, p. 1470-1748, 2014.

VENTURI, G. et al. A novel splicing mutation in *FKBP10* causing osteogenesis imperfecta with a possible mineralization defect. **Bone**, v. 50, p. 343-349, 2012a.

VENTURI, G. et al. Lack of expression of *SERPINF1*, the gene coding for pigment epithelium-derived factor, causes progressively deforming osteogenesis imperfecta with normal type I collagen. **J Bone Miner Res**, v. 27, p. 729-728, 2012b.

VRANKA, J.A.; SAKAI, L.Y.; BACHINGER, H.P. Prolyl 3-Hydroxylase 1, enzyme characterization and Identification of a novel family of enzymes. **J Biol Chem**, v. 279, p. 23615–23621, 2004.

WILLAERT, A. et al. 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.

YAMADA, T. et al. Recurrence of osteogenesis imperfecta due to maternal mosaicism of a novel *COL1A1* mutation. **Am J Med Genet A**, v. 158A, p. 2969-2971, 2012.

ZHANG, Z. et al. The identification of novel mutations in *COL1A1*, *COL1A2*, and *LEPRE1* genes in Chinese patients with osteogenesis imperfecta. **J Bone Miner Metab**, v. 30, p. 69-77, 2012.

ZHANG, Z. et al. Phenotype and genotype analysis of Chinese patients with osteogenesis imperfecta type V. **PLoS One**, v. 8, 2013.

ZLOTOGORA, J. Germ line mosaicism. **Hum Genet**, v. 102, p. 381-386, 1998.