UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GUILHERME MANSO DE LIMA

**Impacto na expressão de *IGF1R* e *RANKL* e níveis séricos de IGF-1 e
IGFBP-3 do tratamento de ácido zoledrônico comparado com pamidronato
em crianças com Osteogênese Imperfeita**

Ribeirão Preto

2021

GUILHERME MANSO DE LIMA

Impacto na expressão de *IGF1R* e *RANKL* e níveis séricos de IGF-1 e IGFBP-3 do tratamento de ácido zoledrônico comparado com pamidronato em crianças com Osteogênese Imperfeita

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Opção: Investigação em Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Júnior

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desse trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Guilherme Manso de

Impacto na expressão de *IGF1R* e *RANKL* e níveis séricos de IGF-1 e IGFBP-3 do tratamento de ácido zoledrônico comparado com pamidronato em crianças com Osteogênese Imperfeita. Ribeirão Preto, 2021.

141p. : il. ; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente - Opção: Investigação em Pediatria.

Orientador: Martinelli Júnior, Carlos Eduardo

1. Osteogênese Imperfeita. 2. *IGF1R*. 3. *RANKL*. 4. IGF-1. 5. IGFBP-3. 6. Marcadores ósseos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Lima, Guilherme Manso de

Título: “Impacto na expressão de *IGF1R* e *RANKL* e níveis séricos de IGF-1 e IGFBP-3 do tratamento de ácido zoledrônico comparado com pamidronato em crianças com Osteogênese Imperfeita”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Júnior.

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a todas as crianças e adolescentes portadores de Osteogênese Imperfeita e seus familiares, em especial as que fazem seguimento no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Acompanhamos suas lutas e sonhos por melhores condições clínicas, na medida que evoluímos na medicina.

Aos meus pais, Adalberto e Nádia, por terem criado um ambiente em que sempre colocaram os estudos como prioridade em minha vida e dos meus irmãos. À minha mãe pelo exemplo de vida com dedicação ao trabalho e estudos, e ao meu pai pela paciência e orientações.

Aos meus irmãos, Laryssa e Gustavo, pelos exemplos e crescimento juntos.

À minha esposa Bruna, pela sua compreensão e cumplicidade na minha vida acadêmica. Por sempre acreditar e estar presente na minha vida. Pelas muitas sugestões e por compartilhar todo o período de ansiedade e sacrifícios ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Ao meu filho Tarcizio, por compreender minha ausência em muitos momentos durante esses últimos anos em que o papai estava ocupado estudando ou viajando para dar continuidade ao crescimento acadêmico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pelas pessoas que colocou no meu caminho e que me possibilitaram chegar até aqui.

À minha família, que sempre me deu apoio incondicional e incentivo para continuar crescendo e aprimorando meus conhecimentos. Obrigado por toda compreensão nos momentos em que não pude estar presente e por todo amor que fez com que me sentisse mais forte para prosseguir.

Ao Professor Dr. Carlos Eduardo Martinelli Júnior, por me encorajar e acreditar na minha capacidade de desenvolver esta pesquisa. Agradeço pelos ensinamentos tanto durante a residência quanto no doutorado.

À Dra. Soraya Lopes Sader, pelo companheirismo e apoio. Sempre solicita nas dúvidas e dificuldades. Obrigado pelos conselhos e por todo conhecimento que compartilhou comigo.

Ao Professor Dr. Francisco José Albuquerque de Paula, pelo incentivo a esta pesquisa e por todos os anos dedicados à endocrinologia.

À equipe de endocrinologia da UFTM (Uberaba-MG), em especial a Dra. Heloisa Marcelina Cunha Palhares e Dra. Adriana Paula da Silva pelos sábios conselhos e ensinamentos.

À equipe do Laboratório de Pediatria – Biologia Molecular, em especial a Veridina Kill Suazo, Rosane Gomes de Paula Queiroz e Elisabeth Perna, sem as quais não seria possível concluir este trabalho. Também aos pós-graduandos do laboratório molecular de pediatria, sempre trabalhando com muita dedicação, responsabilidade e respeito aos usuários do Hospital de Clínicas.

À equipe do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo Ósseo HC-FMRP-USP, em especial a Maria Fernanda Brondi, Marta Tocico Nakao Inouye e Iana Mizumukai, pela ajuda imprescindível neste projeto. A determinação, talento e comprometimento de cada uma de vocês torna esta equipe admirável.

Ao bioestatístico Davi Casale Aragon pela pronta disponibilidade e auxílio nas análises estatísticas.

À toda equipe de enfermagem do Hospital Dia, por me permitirem fazer parte da rotina de trabalho de vocês e por terem me acolhido de forma tão amigável. Sou grato pelo auxílio nas

coletas e pelo carinho que sempre tiveram com todas as crianças participantes desta pesquisa. Parabéns pela devoção cotidiana na assistência à saúde e cuidado prestados a cada pessoa.

Aos residentes da endocrinologia pediátrica, pelo auxílio na realização das coletas e nos ambulatorios, agradeço também pela compreensão e amizade.

À equipe de docentes e médicos assistentes da pediatria e endocrinologia, por serem fonte de inspiração e admiração. Agradeço a cada um por terem me acolhido e terem me dado a honra de, temporariamente, ser parte desta equipe.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, por ser esta potência nos três pilares do ensino superior: ensino, pesquisa e extensão.

À Vera Lúcia de Andrade Hamanaka, secretária do Departamento de Pediatria e Puericultura do HC-FMRP-USP, pela paciência e ajuda fundamental para a realização desta dissertação.

Às crianças que participaram do projeto e seus responsáveis o meu eterno agradecimento. Obrigado por aceitarem fazer parte da evolução científica da Universidade e do País, a compreensão e colaboração de vocês torna possível o crescimento da produção científica e possibilita melhores tratamentos no futuro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2017/23842-8.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

LIMA, Guilherme Manso de. **Impacto na expressão de *IGF1R* e *RANKL* e níveis séricos de IGF-1 e IGFBP-3 do tratamento de ácido zoledrônico comparado com pamidronato em crianças com Osteogênese Imperfeita.** 2021. 141f. Tese (Doutorado) –Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A osteogênese imperfeita (OI) é uma doença genética caracterizada por alterações no colágeno do tipo I, que determinam um espectro amplo de alterações clínicas. Embora não haja tratamento específico, os medicamentos da classe bisfosfonatos são utilizados com o objetivo da melhora na qualidade óssea com redução dos eventos de fraturas e ganho na qualidade de vida. No Brasil, os protocolos atuais utilizam o pamidronato, bisfosfonato de segunda geração. O uso do ácido zoledrônico, bisfosfonato de terceira geração, apresenta segurança e efeitos similares, com a vantagem de reduzir o tempo de permanência hospitalar. O ligante do RANK (*RANKL*) é o principal atuante na diferenciação dos osteoclastos da qual também participa o IGF-1 mediante interação com seu receptor específico tipo 1 (*IGF1R*). Entretanto, não existem estudos comparando o tratamento com bisfosfonatos no que diz respeito a seu impacto sobre o sistema IGF, o ligante do RANK e fatores determinantes do crescimento. Esse trabalho objetivou avaliar as expressões de RNAm de *IGF1R* e *RANKL*, e as concentrações séricas de IGF-1 e IGFBP-3 e marcadores ósseos, em pacientes com OI em uso de bisfosfonatos e comparar esses parâmetros em grupos de pacientes em uso de pamidronato com aqueles em uso de ácido zoledrônico. Foram estudados 21 pacientes com diagnóstico de OI em modelos transversal e longitudinal. As variáveis foram comparadas entre as formas leves e moderadas-graves da OI. Os participantes foram randomizados em dois grupos: grupo A em uso de pamidronato e o grupo B que houve a troca do pamidronato por ácido zoledrônico. Esses foram acompanhados de forma longitudinal para avaliar influência do pamidronato e do ácido zoledrônico em um e dois ciclos das medicações. No estudo transversal, em que todos os participantes estavam em uso de pamidronato, foi encontrado, sem diferença estatística, menor expressão de *IGF1R* e menores níveis de IGF-1, IGFBP-3 e osteocalcina e maior expressão de *RANKL*, na OI tipo III. Quando os indivíduos foram agrupados de acordo com a gravidade, a altura, as concentrações de fosfatase alcalina sérica e a densidade mineral óssea foram maiores no grupo com a forma leve. Embora não tenha encontrado diferença estatística, a expressão de RNAm de *RANKL* foi menor e a de *IGF1R* foi maior no grupo com forma leve da doença. Quando avaliados a influência de um ciclo de medicações diferentes, não houve diferenças significantes das variações das médias das variáveis entre os grupos de tratamento, embora ocorreu aumento da expressão de RNAm de *IGF1R* e *RANKL* mais evidente no grupo B. Na avaliação de dois ciclos das medicações houve diferença significativa das variações das médias das variáveis na análise de *IGF1R*, com aumento da expressão no grupo B e queda no grupo A. Em conclusão, os dados sugerem que ocorre aumento da expressão do *IGF1R* após dois ciclos do tratamento com ácido zoledrônico em crianças previamente tratadas com pamidronato. Ao passo que as expressões de *RANKL*, concentrações séricas de IGF-1 ou IGFBP-3 são normais e semelhantes tanto nos indivíduos em uso de pamidronato quanto nos em uso de ácido zoledrônico.

Palavras-chave: Osteogênese Imperfeita. *IGF1R*. *RANKL*. IGF-1. IGFBP-3. Marcadores ósseos. Crianças. Adolescentes.

ABSTRACT

LIMA, Guilherme Manso de. **Impact on the expression of *IGF1R* and *RANKL* and serum levels of IGF-1 and IGFBP-3 from the treatment of zoledronic acid compared to pamidronate in children with Osteogenesis Imperfecta**. 2021. 141f. Thesis (Doctorate) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Osteogenesis imperfecta (OI) is a genetic disease characterized by changes in type I collagen, which determine a broad spectrum of clinical changes. Although there is no specific treatment, bisphosphonate drugs are used to improve bone quality by reducing fracture events and improving quality of life. In Brazil, current protocols use pamidronate, second generation bisphosphonate. The use of zoledronic acid, third generation bisphosphonate, has safety and similar effects, with the advantage of reducing the hospitalization time. The RANK ligand (*RANKL*) is the main agent in the differentiation of osteoclasts in which IGF-1 also participates through interaction with its specific type 1 receptor (*IGF1R*). However, there are no studies comparing bisphosphonate treatment concerning their impact on the IGF system, the RANK ligand and growth-determining factors. This work aimed to evaluate the *IGF1R* and *RANKL* mRNA expressions, the serum concentrations of IGF-1 and IGFBP-3 and bone markers, in patients with OI using bisphosphonates and to compare these parameters in groups of patients using pamidronate with those in use of zoledronic acid. Twenty-one patients diagnosed with OI were studied in cross-sectional and longitudinal models. The variables were compared between mild and moderate-severe forms of OI. The participants were randomized into two groups: group A using pamidronate and group B that pamidronate was replaced by zoledronic acid. These were followed up longitudinally to assess the influence of pamidronate and zoledronic acid in one and two cycles of medications. In the cross-sectional study, in which all participants were using pamidronate, without statistical difference, less expression of *IGF1R* and lower levels of IGF-1, IGFBP-3 and osteocalcin were found and greater expression of *RANKL*, in OI type III. When individuals were grouped according to severity, height, serum alkaline phosphatase concentrations and bone mineral density were higher values in the group with the mild form. Although there was no statistical difference, the expression of *RANKL* mRNA was lower and that of *IGF1R* was higher in the group with mild form of the disease. When assessing the influence of different medication cycle, there were no significant differences in the variations of the means of the variables between the treatment groups, although there was an increase in the expression of *IGF1R* and *RANKL* mRNA in group B. In the assessment of two medications cycles, there was a significant difference in the variations of the means of the variables in the *IGF1R* analysis, with an increase in expression in group B and a decrease in group A. In conclusion, the data suggest that there is an increase in the expression of *IGF1R* after two cycles of treatment with zoledronic acid in children previously treated with pamidronate. Whereas the expressions of *RANKL*, serum concentrations of IGF-1 or IGFBP-3 are normal and similar both in individuals using pamidronate and in those using zoledronic acid.

Keywords: Osteogenesis Imperfecta. *IGF1R*. *RANKL*. IGF-1. IGFBP-3. Bone markers. Children. Teenagers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estatura e IMC (em escore-Z) de cada indivíduo divididos pelo diagnóstico de OI. Linha contínua representa mediana.....	72
Figura 2 - Expressão de RNAm de <i>IGF1R</i> (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) de cada indivíduo agrupados pelo diagnóstico de OI. Linha contínua representa mediana.....	74
Figura 3 - Expressão de RNAm de <i>RANKL</i> (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) de cada indivíduo agrupados pelo diagnóstico de OI. Linha contínua representa mediana.....	75
Figura 4 - IGF-1 e IGFBP-3 (em escore-Z ajustado para sexo e estadiamento puberal) de cada indivíduo agrupados pelo diagnóstico de OI. Linha contínua representa mediana.....	76
Figura 5 - Osteocalcina (em ng/ml) de cada indivíduo agrupados pelo diagnóstico de OI. Linha contínua representa mediana.....	77
Figura 6 - Boxplot da estatura e IMC (valores representados em escore-Z) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana.....	82
Figura 7 - Boxplot da expressão gênica de RNAm de <i>IGF1R</i> e <i>RANKL</i> (valores representados em $2^{-\Delta\Delta CT}$) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana.....	82
Figura 8 - Boxplot do IGF-1 e IGFBP-3 (valores representados em escore-Z ajustados pelo estadiamento puberal) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana.....	83
Figura 9 - Boxplot da osteocalcina (valores representados em ng/ml) e DXA (valores representados em escore-Z) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana.....	83
Figura 10 - Variação da expressão de RNAm de <i>IGF1R</i> (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo.....	87
Figura 11 - Variação da expressão de RNAm de <i>RANKL</i> (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo.....	87
Figura 12 - Variação de IGF-1 (em ng/ml) entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo.....	88
Figura 13 -Variação de IGFBP-3 (em µg/ml) entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo.....	88
Figura 14 - Variação de Osteocalcina (em ng/ml) entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo.....	89
Figura 15 - Boxplot da diferença da variação das médias da expressão gênica de RNAm de <i>IGF1R</i> (valores representados em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana.....	92
Figura 16 - Boxplot da diferença da variação das médias da expressão gênica de RNAm de <i>RANKL</i> (valores representados em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana.....	93

Figura 17 - Boxplot da diferença da variação das médias de IGF-1 (valores representados em escore-Z) entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana.....	93
Figura 18 - Boxplot da diferença da variação das médias de IGFBP-3 (valores representados em escore-Z) entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana.....	94
Figura 19 - Boxplot da diferença da variação das médias de osteocalcina (valores representados em ng/ml) entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana.....	94
Figura 20 - Variação da expressão de RNAm de <i>IGF1R</i> (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo.....	95
Figura 21 - Variação da expressão de RNAm de <i>RANKL</i> (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo.....	95
Figura 22 - Variação de IGF-1 (em ng/ml) entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo.....	96
Figura 23 - Variação de IGFBP-3 (em µg/ml) entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo.....	96
Figura 24 - Variação de Osteocalcina (em ng/ml) entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação Clínica da OI.....	26
Tabela 2 - Classificação genética da OI de acordo com OMIM.....	28
Tabela 3 - Descrição de cada indivíduo participante do estudo conforme sexo, tipo de diagnóstico de OI, idade no momento da primeira coleta, estadiamento puberal e o grupo de randomização.....	39
Tabela 4 - Descrição das medicações aplicadas nos tempos de coletas de exames e avaliação clínica.....	40
Tabela 5 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo A em cada tempo do estudo.....	50
Tabela 6 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo B em cada tempo do estudo.....	51
Tabela 7 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo C em cada tempo do estudo.....	52
Tabela 8 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo D em cada tempo do estudo.....	53
Tabela 9 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo E em cada tempo do estudo.....	54
Tabela 10 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo F em cada tempo do estudo.....	55
Tabela 11 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo G em cada tempo do estudo.....	56
Tabela 12 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo H em cada tempo do estudo.....	57
Tabela 13 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo I em cada tempo do estudo.....	58
Tabela 14 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo J em cada tempo do estudo.....	59
Tabela 15 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo K em cada tempo do estudo.....	60
Tabela 16 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo L em cada tempo do estudo.....	61

Tabela 17 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo M em cada tempo do estudo.....	62
Tabela 18 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo N em cada tempo do estudo.....	63
Tabela 19 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo O em cada tempo do estudo.....	64
Tabela 20 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo P em cada tempo do estudo.....	65
Tabela 21 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo Q em cada tempo do estudo.....	66
Tabela 22 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo R em cada tempo do estudo.....	67
Tabela 23 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo S em cada tempo do estudo.....	68
Tabela 24 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo T em cada tempo do estudo.....	69
Tabela 25 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo U em cada tempo do estudo.....	70
Tabela 26 - Descrição dos indivíduos na avaliação transversal do estudo de acordo com o estadiamento puberal - média das seguintes características: idade (anos), estatura (escore-Z) e IMC (escore-Z).....	73
Tabela 27 - Descrição dos indivíduos na avaliação transversal do estudo de acordo com o estadiamento puberal - média das seguintes características: Expressão de <i>IGF1R</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$), expressão de <i>RANKL</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$), IGF-1 (ng/ml / escore-Z) e IGFBP-3 (µg/ml / escore-Z).....	73
Tabela 28 - Descrição dos resultados dos marcadores bioquímicos e escore-Z da densitometria óssea (DXA) na avaliação transversal dos 21 participantes do estudo.....	78
Tabela 29 – Comparação das variáveis contínuas, na avaliação transversal do estudo, de acordo com a classificação clínica da OI – Médias representadas em anos para idade, em escore padrão para Estatura, IMC, IGF-1 e IGFBP-3 (escore-Z), em $2^{-\Delta\Delta CT}$ para as expressões gênicas de <i>IGF1R</i> e <i>RANKL</i> e ng/ml para osteocalcina.....	79
Tabela 30 - Comparação das variáveis contínuas, na avaliação transversal do estudo, dos grupos com crianças que apresentam formas leves e formas moderadas e graves, representadas em médias e desvio padrão (DP).....	81

Tabela 31 - Descrição dos grupos que foram elegíveis a participar da avaliação longitudinal de um ciclo das medicações, quanto a sexo, idade, classificação da OI e estadiamento puberal.....	85
Tabela 32 - Descrição dos grupos A e B – avaliação longitudinal de um ciclo das medicações- nas coletas dos tempos 3 e 4: representação das variáveis.....	86
Tabela 33 - Comparação das variações dos resultados dos parâmetros analisados entre as coletas 3 e 4 dos grupos A e B.....	86
Tabela 34 - Motivo de exclusão dos indivíduos da avaliação longitudinal de dois ciclos das medicações.....	90
Tabela 35 - Descrição dos grupos que foram elegíveis a participar da avaliação longitudinal de dois ciclos das medicações, quanto ao sexo, idade, classificação da OI e estadiamento puberal.....	91
Tabela 36 - Descrição dos grupos A e B – avaliação longitudinal de dois ciclos das medicações - nas coletas dos tempos 3 e 5: representação das variáveis.....	91
Tabela 37 - Comparação das variações dos resultados dos parâmetros analisados entre as coletas 3 e 5 dos grupos A e B.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alb	Albumina
ADOMI	Ambulatório de Doenças Ósseas Metabólicas Infantis
Ca	Cálcio
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar ou <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CEP	Comitê de ética e Pesquisa
CL	Coluna Lombar
Cm	Centímetros
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
Cr	Creatinina
CTX	Telopectídeo do colágeno tipo 1 ou <i>Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMO	Densidade mineral óssea
DP	Desvio padrão
DXA	Densitometria óssea
EP	Estadiamento Puberal
FA	Fosfatase alcalina
GH	Hormônio de crescimento ou <i>Growth hormone</i>
HC-FMRP	Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
ICr	Intervalo de Credibilidade
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina ou <i>insulin-like growth factor</i>
IGF1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 ou <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IGFBP	Proteína transportadora do IGF ou <i>growth hormone binding protein</i>
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
InsR	Receptor de Insulina ou <i>Insulin Receptor</i>
JAK	Enzima Janus Kinase

Kg	Quilogramas
Kg/m ²	Quilos por metro quadrado
L	Litros
L1	Primeira vértebra da coluna lombar
L4	Quarta vértebra da coluna lombar
M	Metros
Mg	Miligramas
Mg	Magnésio
mL	Mililitros
MS	Ministério da Saúde
Ng	Nanogramas
NTX	Telopectídeo aminoterminal do colágeno tipo 1 ou <i>amino-terminal telopeptide</i>
OI	Osteogênese Imperfeita
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
P1NP/P1CP	Propetídeos de colágeno tipo 1 amino e carboxiterminais ou <i>pro-collagen type 1 N-terminal and C-terminal</i>
PBS	Tampão fosfato-salino ou <i>phosphate buffered saline</i>
Pi	Fósforo inorgânico
PTH	Paratormônio
qRT-PCR	Reação em cadeia de Polimerase em tempo real ou <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RANK	Receptor ativador do Fator nuclear Kappa B ou <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RANKL ou TNFSF11	Receptor ativador do Fator nuclear Kappa B ligante ou <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand ou Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 11</i>
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro ou <i>messenger ribonucleic acid</i>
Rpm	Rotações por minuto
SB	Síndrome de Bruck
Sd	Síndrome
TA	Termo de Assentimento

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa ou <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRACP	Fosfatase ácida tartarato-resistente ou <i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
U	Unidade
Ur	Uréia
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Manifestações clínicas e radiológicas no indivíduo com Osteogênese Imperfeita	23
1.2 Classificação Clínica da Osteogênese Imperfeita.....	24
1.3 Alterações Moleculares na Osteogênese Imperfeita.....	27
1.4 Tratamento dos indivíduos com Osteogênese Imperfeita.....	29
1.5 Expressão gênica de <i>RANKL</i> e marcadores ósseos na Osteogênese Imperfeita.....	30
1.6 Expressão gênica de <i>IGF1R</i> e eixo do hormônio de crescimento na Osteogênese Imperfeita.....	31
1.7 Justificativa.....	33
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo primário	35
2.2 Objetivos secundários.....	35
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS:.....	37
3.1 Tipo de estudo	37
3.2 População do estudo	37
3.2.1 Critérios de inclusão no estudo.....	37
3.2.2 Critérios de Exclusão do estudo	37
3.2.2.1 Critérios de exclusão da parte 1 do estudo (estudo transversal).....	37
3.2.2.2 Critérios de exclusão das partes 2 e 3 (estudos longitudinais)	38
3.3 Desenho do estudo.....	38
3.3.1 Parte 1 do estudo: estudo transversal.....	40
3.3.2 Parte 2 do estudo: Análise dos parâmetros sobre influência de um ciclo de Bisfosfonatos diferentes	40
3.3.3 Parte 3 do estudo: Análise dos parâmetros sobre a influência de dois ciclos de Bisfosfonatos diferentes	41
3.4 Protocolos das medicações bisfosfonatos.....	41
3.4.1 Protocolo com a medicação Pamidronato (protocolo vigente no serviço)	42
3.4.2 Protocolo com a medicação Ácido Zoledrônico (protocolo proposto para o serviço)	42
3.5 Variáveis analisadas	43
3.5.1 Avaliação antropométrica, estadiamento puberal e eventos clínicos	43
3.5.2 Densitometria óssea.....	43

3.5.3 Análise da expressão gênica de <i>IGF1R</i> e <i>RANKL</i>	44
3.5.3.1 Processamento das amostras de sangue periférico	44
3.5.3.2 Extração do RNA.....	44
3.5.3.3 Quantificação do RNA	45
3.5.3.4 Síntese de cDNA	45
3.5.3.5 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	45
3.5.4 Análise sérica de IGF-1 e IGFBP-3.....	45
3.5.5 Análise sérica de CTX, Osteocalcina e marcadores bioquímicos	46
3. 6 Banco de dados e armazenamento.....	46
3.7 Análise estatística	46
3.8 Aspectos éticos	47
4 RESULTADOS	49
4.1 Descrição de cada indivíduo conforme suas características clínicas e intercorrências por tempo de coleta.....	49
4.1.1 Indivíduo A.....	49
4.1.2 Indivíduo B	50
4.1.3 Indivíduo C	51
4.1.4 Indivíduo D.....	52
4.1.5 Indivíduo E:	53
4.1.6 Indivíduo F	54
4.1.7 Indivíduo G.....	55
4.1.8 Indivíduo H.....	56
4.1.9 Indivíduo I	57
4.1.10 Indivíduo J	58
4.1.11 Indivíduo K.....	59
4.1.12 Indivíduo L	60
4.1.13 Indivíduo M.....	61
4.1.14 Indivíduo N.....	62
4.1.15 Indivíduo O.....	63
4.1.16 Indivíduo P	64
4.1.17 Indivíduo Q.....	65
4.1.18 Indivíduo R.....	66

4.1.19 Indivíduo S	67
4.1.20 Indivíduo T	68
4.1.21 Indivíduo U.....	69
4.2. Estudo transversal no primeiro tempo de coleta.....	70
4.2.1 Dados clínicos-antropométricos dos indivíduos	70
4.2.2 Expressão de RNAm de <i>IGF1R</i>	73
4.2.3 Expressão de RNAm de <i>RANKL</i>	74
4.2.4 IGF-1 e IGFBP-3	75
4.2.5 Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo	77
4.2.6 Avaliação das variáveis conforme o tipo de OI.....	78
4.2.7 Avaliação conforme com a gravidade da doença óssea	80
4.3 Análise dos parâmetros sobre influência de um ciclo de Ácido Zoledrônico vs Pamidronato.....	84
4.4 Análise dos parâmetros sobre influência de dois ciclos de Ácido Zoledrônico vs Pamidronato.....	89
5. DISCUSSÃO	99
5.1 Expressão gênica de RNAm de <i>IGF1R</i>	99
5.2 Estatura, IMC e dosagem sérica de IGF-1 e IGFBP-3	102
5.3 Expressão gênica de RNAm de <i>RANKL</i>	104
5.4 Marcadores ósseos e bioquímicos	106
5.5 Tratamento da OI em crianças.....	107
6. CONCLUSÃO.....	110
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	112
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).....	119
APÊNDICE B - Termo de Assentimento (TA)	123
APÊNDICE C - Descrição das variáveis clínicas e laboratoriais de cada indivíduo por tempo de coleta.....	125
APÊNDICE D- Comparação dos grupos com formas leves e formas moderadas e graves, com as variáveis descritas de acordo com a média, desvio padrão, valor mínimo, quartil inferior, mediana, quartil superior e valor máximo	130
APÊNDICE E- Descrição da variação das médias das variáveis dos grupos A e B, entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53), de acordo com a média, desvio padrão, valor mínimo, quartil inferior, mediana, quartil superior e valor máximo.	131
APÊNDICE F - Distribuição dos parâmetros laboratoriais analisados por idade dos participantes do estudo nos 5 tempos independente da medicação administrada	132

ANEXO A - Protocolo atual de pamidronato padronizado no HC-FMRP-USP.....	136
ANEXO B - Protocolo proposto de ácido zoledrônico	137
ANEXO C – Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa	139

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O termo osteogênese imperfeita (OI) teve sua primeira descrição na literatura entre os anos de 1844 e 1849, quando o médico anatomista e patologista holandês Williem Vrolik descreveu um caso de um recém-nascido falecido três dias após o nascimento com presença de múltiplas fraturas (BALJET, 2002). Passados quase dois séculos após a primeira descrição, muito conhecimento a respeito da patologia foi desvendado, no entanto, há muito ainda a ser entendido.

A OI é uma doença genética caracterizada por fragilidade óssea, cuja causa mais comum são alterações do colágeno tipo 1 (MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020). OI é um termo designado para descrever um grupo de desordens do tecido conjuntivo (MARINI et al., 2017), com incidência estimada de afetar entre 1/10.000-20.000 nascidos (MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020; TOURNIS; DEDE, 2018). É importante salientar que as formas mais leves da doença, nas quais o diagnóstico ocorre em idade mais tardia, não estão incluídas nessas estimativas, o que pode elevar sua prevalência na população (TOURNIS; DEDE, 2018). Não há diferença de prevalência reportada em relação a raça ou sexo (SANTILI et al., 2005).

1.1 Manifestações clínicas e radiológicas no indivíduo com Osteogênese Imperfeita

A OI engloba um amplo espectro clínico, com impacto na formação óssea, caracterizada pela baixa massa óssea e presença de fraturas recorrentes (TOURNIS; DEDE, 2018; RAUCH; GLORIEUX, 2004; FORLINO et al., 2012). As fraturas vertebrais são extremamente comuns, mesmo nas formas leves. As fraturas de arcos costais são comuns nas formas mais graves, contribuindo para anormalidades da parede torácica. Fraturas de ossos longos estão presentes em todos os tipos com taxas variáveis, aumentando a incidência conforme gravidade da doença. (TOURNIS; DEDE, 2018; BEN AMOR et al., 2013). Nas formas mais leves, a prevalência de fraturas normalmente diminui após a adolescência, mas podem voltar a aumentar nas mulheres na pós-menopausa e no pós-parto (TOURNIS; DEDE, 2018; PATERSON; MCALLION; STELLMAN, 1984).

Na radiografia simples de osso, pode haver presença de fraturas (recentes e antigas) e entre as alterações esqueléticas, encurvamento de ossos longos, compressões vertebrais, ossos wormianos (crânio em mosaico), alargamento metafisário, encurtamento diafisário, calos ósseos, protusão acetabular, deformidades de caixa torácica como pectus excavatum ou carinatum e tórax em barril, anormalidades da junção crânio-cervical e alterações de coluna vertebral como cifose e escoliose. Pode apresentar densidade óssea reduzida na avaliação da

densitometria óssea, principalmente nas formas mais severas (MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020; TOURNIS; DEDE, 2018; FORLINO; MARINI, 2016; FORLINO et al., 2012).

Portadores de OI também podem apresentar características extra esqueléticas que incluem esclera azulada ou acinzentada, dentinogênese imperfeita (pode afetar dentição decídua ou permanente), elasticidade aumentada da pele, hipermobilidade articular. Também podem apresentar perda auditiva (que pode ser condutiva, neurosensorial ou mista), menor massa e força musculares, comprometimento de função pulmonar, maior prevalência de doenças valvulares e complicações do sistema nervoso central (MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020).

Indivíduos com OI apresentam menor expectativa de vida quando comparado a população geral, sendo que a morbimortalidade afeta até suas formas mais brandas, com estudo mostrando que a idade média de sobrevivência é de 72,4 anos para homens e 77,4 anos para mulheres (FOLKESTAD et al., 2016). A causa de morte mais comum são as infecções do trato respiratório (agravadas pela presença de deformidades esqueléticas como escoliose grave e deformidades da parede torácica), doenças gastrointestinais e traumas (TOURNIS; DEDE, 2018; FOLKESTAD et al., 2016; MCALLION; PATERSON, 1996).

1.2 Classificação Clínica da Osteogênese Imperfeita

A OI apresenta um amplo espectro clínico, e dessa forma foi proposto um sistema de classificação por Sillence, baseados em critérios clínicos, radiográficos e genéticos, usado até os dias atuais, que subdivide os pacientes em quatro tipos conforme severidade da doença (SILLENCE et al., 1979).

A OI tipo I representa a forma mais branda e apresenta a tríade clássica: fraturas (fragilidade óssea), esclera azulada, e perda auditiva. As fraturas geralmente se iniciam na deambulação e diminuem após a puberdade. Leva a deformidade óssea mínima, permitindo que os pacientes atinjam estatura normal ou próxima ao normal (TOURNIS; DEDE, 2018; VAN DIJK; SILLENCE, 2014; FORLINO et al., 2012). Apresentam maior incidência de fraturas de ossos longos quando comparado a população geral, alta incidência de fraturas com compressão vertebral durante adolescência e cerca de 1/3 desenvolve escoliose (BEN AMOR et al, 2013). A perda auditiva é progressiva no decorrer do tempo, sendo recomendado avaliação audiométrica regular (MACHOL et al., 2019).

A OI Tipo II é a forma mais grave, representada por indivíduos com morte perinatal. A causa mais comum do óbito é insuficiência respiratória, associada com tórax pequeno,

fraturas de arcos costais, pneumonia e anormalidades intrínsecas do colágeno do tecido pulmonar. Os fetos apresentam características esqueléticas, articulares e extra esqueléticas extremamente severas, apresentando ossos longos curtos e arqueados e deficiência acentuada de ossificação de ossos faciais e cranianos detectados em ultrassom fetal com 18-20 semanas de gestação (PALOMO; VILAÇA; LAZARETTI-CASTRO, 2017; VAN DIJK; SILENCE, 2014; FORLINO et al., 2012; MCALLION; PATERSON, 1996; THIBEAULT et al., 1995).

A OI tipo III é a forma não letal mais grave. Apresentam importante morbidade, limitações e mortalidade. Os indivíduos afetados podem apresentar inúmeras fraturas, podendo chegar a centenas, inclusive presentes ao nascimento. Pode levar a deformidade progressiva e baixa estatura extrema. A maioria tem fácies triangular, ossos wormianos, escleras azul-acinzentadas, dentinogênese imperfeita, compressões vertebrais e cifoescoliose progressiva. Muitos têm complicações crânio-cervicais como platibasia ou invaginação basilar (TOURNIS; DEDE, 2018; VAN DIJK; SILENCE, 2014; FORLINO et al., 2012; PHILLIPI; REMMINGTON; STEINER, 2008).

A OI tipo IV (moderado-grave) tem uma ampla sobreposição fenotípica com os tipos I e III. Os indivíduos afetados podem apresentar dezenas de fraturas de ossos longos e variáveis graus de deformidade de ossos longos e coluna, mas muitos conseguem deambular. Apresentam esclera normal e deficiência auditiva não é frequentemente encontrada. Dentro de uma mesma família de acometidos é possível encontrar uma grande variabilidade de apresentação clínica (TOURNIS; DEDE, 2018; VAN DIJK; SILENCE, 2014; FORLINO et al., 2012).

Posteriormente à classificação de Silence, novas formas clínicas foram adicionadas. A OI tipo V, com apresentação clínica manifesta por moderada a severa fragilidade óssea, na qual se observa calcificação de membranas intraósseas, o que leva a restrição na pronação e supinação dos membros e podem apresentar formação de calos hiperplásicos secundários a fraturas e cirurgias ortopédicas (MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020; TOURNIS; DEDE, 2018; TREJO; RAUCH, 2016; VAN DIJK; SILENCE, 2014). A OI tipo VI cursa com acúmulo de osteóide não mineralizado na histologia óssea e a OI tipo VII apresenta manifestação clínica com rizomelia. Como a tipo VI trata-se de um diagnóstico histológico e a tipo VII está restrita a uma comunidade isolada no Canadá, considera-se cinco tipos clínicos de OI (OI tipo I a V) reconhecíveis com métodos de diagnóstico de rotina (história, exame clínico, radiografias) (tabela 1) (TREJO; RAUCH, 2016; TOURNIS; DEDE, 2018).

Tabela 1: Classificação Clínica da OI, Ribeirão Preto, 2021

Tipo	Apresentação	Padrão de Herança	Gene ou locus	Proteína
OI tipo 1	Forma não deformante	AD	COL1A1	<i>a1 chain of type 1 collagen</i>
			COL1A2	<i>a2 chain of type 1 collagen</i>
OI tipo 2	Forma perinatal letal	AD, AR	COL1A1	<i>a1 chain of type 1 collagen</i>
			COL1A2	<i>a2 chain of type 1 collagen</i>
			CRTAP	<i>Cartilage-associated protein</i>
			LEPRE1	<i>Prolyl 3-hydroxylase 1</i>
			PPIB	<i>Cyclophilin B</i>
OI tipo 3	Forma progressivamente deformante	AD, AR	COL1A1	<i>a1 chain of type 1 collagen</i>
			COL1A2	<i>a2 chain of type 1 collagen</i>
			CRTAP	<i>Cartilage-associated protein</i>
			LEPRE1	<i>Prolyl 3-hydroxylase 1</i>
			PPIB	<i>Cyclophilin B</i>
			SERPINH1	<i>Heat-shock protein 47</i>
			BMP1	<i>Bone morphogenetic protein 1</i>
			FKBP10	<i>Peptidyl prolyl isomerase FKBP65</i>
			PLOD2	<i>Lysyl hydroxylase 2</i>
			SERPINF1	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>
			SP7	<i>Osterix</i>
			WNT1	<i>Wingless Family member 1</i>
			TMEM38B	<i>Trimeric intracellular cation channel subtype B</i>
			CREB3L1	<i>cAMP response element-binding protein 3-like 1</i>
OI tipo 4	Forma moderada	AD, AR	SEC24D	<i>Protein-component of COPII complex</i>
			COL1A1	<i>a1 chain of type 1 collagen</i>
			COL1A2	<i>a2 chain of type 1 collagen</i>
			CRTAP	<i>Cartilage-associated protein</i>
			PPIB	<i>Cyclophilin B</i>
			FKBP10	<i>Peptidyl prolyl isomerase FKBP65</i>
			SERPINF1	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>
OI tipo 5	Forma com calcificações de membranas ósseas e/ou calos hipertróficos	AD	WNT1	<i>Wingless Family member 1</i>
			SP7	<i>Osterix</i>
			IFITM5	<i>Bone-restricted ifitm-like protein</i>

Nota: OI: Osteogênese Imperfeita; AD: autossômica dominante; AR: autossômica recessiva

Fonte: TOURNIS; DEDE, 2018.

1.3 Alterações Moleculares na Osteogênese Imperfeita

Como causa da doença, há uma variedade de defeitos quantitativos e qualitativos do colágeno tipo 1 e matriz proteica não colágena, levando a baixa produção ou defeito no processamento do colágeno tipo 1. O colágeno tipo 1 é formado por uma hélice tripla composta de duas cadeias alfa-1, codificada pelo gene *COL1A1*, e uma cadeia alfa-2, codificada pelo gene *COL1A2* (TOURNIS; DEDE, 2018; FORLINO et al., 2012; BYERS; STEINER, 1992; PROCKOP et al., 1993). Alterações patogênicas dos genes *COL1A1* e *COL1A2* contribuem com cerca de 75-85% dos casos de OI (MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020), com uma variação nos diferentes tipos, que pode corresponder desde 63% dos casos de OI tipo 4, passando por 88% dos casos de OI tipo III, até 94% dos casos de OI tipo 1 (TREJO; RAUCH F, 2016; LINDAHL et al., 2015).

Em um número considerável de indivíduos essas mutações estão ausentes (15-25% dos casos) (MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020), e mutações em diferentes genes podem ser a provável causa da patologia (AITCHISON et al., 1988; WALLIS et al., 1993). Atualmente, sabe-se que o número de genes envolvidos engloba não somente as mutações nos *COL1A1* e *COL1A2*, mas vários outros descobertos posteriormente que codificam proteínas envolvidas na estrutura tripla hélice do colágeno (TOURNIS; DEDE, 2018).

Mutações desses genes podem estar envolvidos em mecanismos como: mineralização da matriz extracelular (*IFITM5*, *SERPINH1* e *SPARC*), modificação pós-tradução e dobramento de colágeno fibrilar (*CRTAP*, *P3H1* e *PPIB*), dobramento e tráfego intracelular do colágeno (*SERPINH1* e *FKBP10*), diferenciação anormal dos osteoblastos (*SP7*), processamento do colágeno (*BMP1*), homeostase do cálcio no retículo endoplasmático (*TMEM38B*), papel na função anabólica óssea da via de sinalização canônica WNT (*LRP5*, *WNT1* e *MESD*) e controle de qualidade de síntese proteica e resposta ao estresse do retículo endoplasmático (*CREB3L1* e *MBTPS2*) (MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020; MORTIER et al., 2019; SEMLER et al., 2012; LIM et al, 2017) (tabela 2).

Cada descoberta de gene associada a OI deu origem a um novo tipo de OI, com designação numérica crescente (a partir de OI tipo VIII), e essas foram listadas no banco de dados *Online Mendelian Inheritance of Man* (OMIM) (tabela 2). Essa classificação genotípica é complicada, uma vez que muitos centros não contam com meios de diagnóstico molecular. Adicione-se a isso o fato da classificação fenotípica (OI tipo I a V) facilitar a comunicação entre os clínicos (TREJO; RAUCH, 2016; VAN DIJK; SILENCE, 2014). Dessa forma, a classificação baseada em fenótipo foi proposta pelo 2015 *Nosology and Classification of*

Genetic Skeletal Disorders (Nosologia e classificação de doenças esqueléticas genéticas de 2015) (tabela 1) (TREJO; RAUCH, 2016; BONAFE et al., 2015).

Tabela 2: Classificação genética da OI de acordo com OMIM, Ribeirão Preto, 2021

OI Tipo	Gene	OMIM#	Herança	
I	COL1A1 COL1A2	166200	AD	Quantidade reduzida de colágeno tipo I
II	COL1A1 COL1A2	166210	AD	Dobramento, secreção e mineralização de colágeno tipo I
III	COL1A1 COL1A2	259420	AD	Dobramento, secreção e mineralização de colágeno tipo I
IV	COL1A1 COL1A2	166220	AD	Dobramento, secreção e mineralização de colágeno tipo I
V	IFITM5	610967	AD	Mineralização da matriz extracelular
VI	SERPINF1	613982	AR	Mineralização da matriz extracelular
VII	CRTAP	610682	AR	Modificação pós traducional e dobramento de colágeno fibrilar
VIII	P3H1	610915	AR	Modificação pós traducional e dobramento de colágeno fibrilar
IX	PPIB	259440	AR	Modificação pós traducional e dobramento de colágeno fibrilar
X	SERPINH1	613848	AR	Dobramento e tráfego intracelular de colágeno
XI	FKBP10	610968	AR	Dobramento e tráfego intracelular de colágeno
XII	SP7	613849	AR	Diferenciação anormal de osteoblastos
XIII	BMP1	614856	AR	Processamento do colágeno
XIV	TMEM38B	615066	AR	Homeostase do cálcio no retículo endoplasmático
XV	WNT1	615220	AR	Sinalização anabólica WNT
XVI	CREB3L1	616229	AR	Controle de qualidade de proteínas e resposta de estresse do retículo endoplasmático
XVII	SPARC	616507	AR	Mineralização da matriz extracelular
XVIII	TENT5A	617952	AR	Desconhecido
XIX	MBTPS2	301014	XLR	Controle de qualidade de proteínas e resposta de estresse do retículo endoplasmático
XX	MESD	618644	AR	Sinalização anabólica WNT

Nota: OI: Osteogênese Imperfeita; OMIM: *Online Mendelian Inheritance of Man*; AD: autossômica dominante; AR: autossômica recessiva; XLR: recessiva ligada ao X

Fonte: MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020

1.4 Tratamento dos indivíduos com Osteogênese Imperfeita

Entre os objetivos do tratamento dos pacientes com OI destacam-se a redução de incidência de fratura, redução da deformidade óssea, tratamento da dor óssea, melhora de mobilidade, crescimento e vida independente, manejo de manifestações extra esqueléticas e prevenção de efeitos adversos dos medicamentos a curto e longo prazo (TOURNIS; DEDE, 2018). O tratamento dos pacientes com OI, que varia conforme o fenótipo apresentado, inclui desde condutas conservadoras até procedimentos cirúrgicos e tratamento farmacológico, com o uso de bisfosfonatos (TREJO; RAUCH, 2016; VAN DIJK; SILLANCE, 2014).

Os bisfosfonatos são amplamente utilizados há mais de 3 décadas (TREJO; RAUCH, 2016; DEVOGELAER et al., 1987). Apresentam seu mecanismo de ação pela redução da reabsorção óssea com atuação na inibição da função dos osteoclastos, o que leva a um aumento da qualidade da matriz óssea, tornando-os mais resistentes a fraturas (MCCLUNG et al., 2013; RAUCH; GLORIEUX, 2006; CHEUNG; GLORIEUX, 2008).

Nos pacientes em tratamento com bisfosfonatos, quando avaliado a histologia óssea, observa-se aumento da espessura cortical e número de trabéculas, com melhora do escore padrão (escore-Z) na densitometria óssea (BACHRACH; WARD, 2009; PHILLIPI; REMMINGTON; STEINER, 2008; PALOMO et al., 2015). Com o uso dos bisfosfonatos, observa-se aumento da massa óssea enquanto houver crescimento ósseo (TREJO; RAUCH, 2016; CHEUG; GLORIEUX, 2008).

A terapia medicamentosa com essa classe de medicamentos parece estar associada a uma menor taxa de fraturas de ossos longos em crianças com OI, o que indica alguma eficácia terapêutica, entretanto fraturas de ossos longos continuam a ocorrer (LINDAHL et al., 2015; PALOMO et al., 2015). O tratamento tem um efeito marcante sobre a coluna vertebral de crianças em crescimento com OI, sendo a remodelação da vértebra comprimida um processo dependente do crescimento remanescente (TREJO; RAUCH, 2016; ALCAUSIN et al., 2013; LETOCHA et al, 2005). Apesar das melhorias na forma de cada vértebra, não parece ter um efeito importante no desenvolvimento de escoliose (TREJO; RAUCH, 2016).

Entre os bisfosfonatos utilizados nos protocolos estão o pamidronato e o ácido zoledrônico. O ácido zoledrônico é um bisfosfonato mais potente, que pode ser administrado em doses mais baixas, menor tempo de infusão e menor frequência. O perfil de efeitos colaterais do zoledronato é semelhante ao do pamidronato, sendo o bisfosfonato de escolha em poucos serviços no mundo (SARAFF et al., 2017).

1.5 Expressão gênica de *RANKL* e marcadores ósseos na Osteogênese Imperfeita

Os osteoblastos, células responsáveis pela formação óssea, tem importante papel na produção da matriz óssea, na qual o principal componente é o colágeno tipo 1. Essa matriz óssea quando mineralizada, vai formar o osso maduro (CASTRO, 2014). Na vigência de osteoblastos disfuncionais, ossos podem ser mais frágeis. Os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, provavelmente também são indiretamente afetados pelos defeitos do colágeno tipo 1 (ZIMMERMAN et al., 2018).

É descrito que os osteoclastos estavam presentes em maior número na estrutura óssea de crianças com OI quando comparadas a crianças sem a doença. As crianças com OI apresentavam um alto estado de renovação óssea, com aumento acentuado dos índices de formação e reabsorção óssea (RAUCH et al., 2000). Dessa forma, marcadores de formação óssea como osteocalcina, fosfatase alcalina e propéptídeos de colágeno tipo 1 amino e carboxiterminais (P1NP/P1CP), assim como marcadores de reabsorção óssea como telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1 (CTX), telopeptídeo aminoterminal do colágeno tipo 1 (NTX), piridinolinas e fosfatase ácida tartarato-resistente (TRACP), podem estar alterados. O CTX é sintetizado a partir da catepsina K, uma protease específica para osteoclastos, e pode ser mensurado em soro, plasma ou urina. A osteocalcina é sintetizada por osteoblastos e seus níveis circulantes são altamente específicos para o osso. A osteocalcina sofre degradação e excreção renal, dessa forma seus fragmentos podem estar elevados em caso de insuficiência renal (SZULC, 2018).

Há ainda um terceiro tipo de células ósseas, os osteócitos. Esse tipo celular influencia na formação e função dos osteoblastos e osteoclastos. Essa atuação se faz através da síntese e secreção de fatores de crescimento, citocinas, como ligantes WNT, esclerostina, e o ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa (RANK), o RANKL (ZIMMERMAN et al., 2018).

O RANK é expresso em células da linhagem osteoclástica e sua ativação leva a diferenciação dessas células. O RANKL é o principal atuante na diferenciação dos osteoclastos, é produzido por osteoblastos e osteócitos. Quando há a indução da formação osteoclástica, observa-se o aumento da atividade absorviva óssea. A osteoprotegerina (OPG) atua na regulação dessa via. A OPG atua como um receptor decodificador do RANKL, e quando se liga a essa molécula, impede que o RANKL se ligue ao RANK, e dessa forma impede a diferenciação osteoclástica (VILAÇA; LAZARETTI-CASTRO, 2014). Sabe-se que o RANKL é estimulado por hormônios calciotrópicos como o paratormônio (PTH), peptídeo ligado ao PTH, 1,25 hidroxivitamina D, interleucinas (IL-1, IL-11, IL-17), TNF-alfa e prostaglandinas (KOHLI et al., 2011).

Ratos com diagnóstico de osteogênese imperfeita apresentam associação da perda de RANKL em osteócitos com o aumento substancial da massa óssea esponjosa (ZIMMERMAN et al., 2018). O conhecimento operacional da via RANK/RANKL/OPG é recente, e o papel dos bisfosfonatos nessa via ainda é incerto. É incerto se na OI há alguma alteração nesta via. Nos últimos anos, drogas com mecanismo de ação antirreabsortivo como anticorpos anti-RANKL estão em estudos em ensaios clínicos (MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020).

O gene responsável pela codificação do RANKL também é conhecido como *Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Member 11 (TNFSF11)*. Há poucos estudos sobre a expressão de RANKL em crianças com OI e não encontramos relatos na literatura sobre comparação do impacto de pamidronato e ácido zoledrônico na expressão desse gene.

1.6 Expressão gênica de *IGF1R* e eixo do hormônio de crescimento na Osteogênese Imperfeita

A OI pode levar a um déficit de estatura importante quando comparado a população sem a doença, com maior comprometimento nas formas moderadas e graves (MAROM; RABENHORST; MORELLO, 2020). Isso gera indagações se alterações do eixo do hormônio de crescimento (GH) – sistema de fatores de crescimento insulina símile (IGFs) poderiam participar e influenciar nesse déficit estatural.

O hormônio do crescimento (GH) exerce suas ações mediante receptor específico (GHR), o qual se apresenta no organismo na forma de dímero, sofrendo alterações de conformação após sua ligação com o GH (BROWN et al., 2005). A transmissão do sinal ocorre mediante a ativação e fosforilação da enzima Janus Kinase 2 (JAK 2), o que resulta na sinalização intracelular mediada pela STAT 5 (*signal transducers and activators of transcription 5*), que é importante nas ações somatotróficas do GH, com participação na regulação do IGF-1 e IGFBP-3 (KOFOED et al., 2003).

Os IGFs (IGF-1 e IGF-2) são fatores de crescimento peptídico, produzidos na maioria dos órgãos e tecidos do organismo. Apresentam ações endócrinas, parácrinas e autócrinas. O crescimento adequado depende tanto do IGF-1 circulante de origem hepática quanto dos que são produzidos nos tecidos, principalmente a nível ósseo (SJOGREN et al., 1999; YAKAR et al., 2002). Os IGFs associam-se à família de proteínas transportadoras denominadas IGFBPs (*insulin-like growth factor binding proteins*) (JONES et al., 1995).

Seis IGFBPs foram sequenciadas: IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-6. As IGFBPs são produzidas em diversos órgãos e tecidos do organismo e cada

IGFBP possui regulação independente e características próprias (JONES et al., 1995). A IGFBP-3 é a mais abundante na circulação e assim como o IGF-I e IGFBP-5, tem a sua secreção estimulada pelo hormônio do crescimento (GH), apresentando concentrações séricas reduzidas em diversas doenças crônicas (MARTINELLI; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008).

Os IGFs exercem suas ações mediante interação com dois receptores específicos, o receptor de IGF tipo 1 (IGF1R) e o receptor de IGF tipo 2 (IGF2R). Todas as ações descritas dos IGFs sobre o processo de multiplicação e diferenciação celular, crescimento e metabolismo intermediário ocorrem via interação do IGF-1 com o IGF1R. O IGF1R apresenta estrutura similar ao receptor de insulina (InsR), é composto por 2 subunidades alfa e 2 subunidades beta. A subunidade alfa contém os sítios de ligação e unem-se aos ligantes numa relação 1:1. A subunidade beta possui uma parte transmembrânica, um sítio acoplado a ATP e uma região com atividade tirosina cinase intrínseca. Essa última, ao ser ativada, promove fosforilação de resíduos de tirosina do próprio receptor e de proteínas-substrato associadas. A semelhança estrutural entre o IGF1R e o InsR permite que o IGF-1 também se ligue e atue em receptores híbridos, metade IGF1R e metade InsR (MARTINELLI; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008).

Em relação ao crescimento dos pacientes com OI, apenas pacientes com formas leves podem não apresentar comprometimento estatural. Pacientes com formas moderadas e graves (OI tipo III e IV), apresentam comprometimento severo da velocidade de crescimento. Poucos estudos na literatura mostram correlação dos níveis de IGF-1 e IGFBP-3 com associação altura-peso em crianças com OI (HOYER-KUHN et al., 2016).

O hormônio do crescimento (GH) e os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são potentes estimuladores do crescimento ósseo longitudinal. O sistema GH-IGFs tem atuação nos condrócitos das zonas proliferativas e hipertróficas da placa de crescimento (NILSSON et al., 2005; VAN DER EERDEN; KARPERIEN; WIT, 2003).

Não existem informações referentes a expressão do *IGF1R* em crianças com OI e o impacto do tratamento com bisfosfonatos sobre a sua expressão. Dessa forma esse estudo busca entender a participação do eixo GH-IGF e a expressão de *IGF1R* na resposta terapêutica de crianças e adolescentes com diagnóstico de OI em uso de bisfosfonatos.

1.7 Justificativa

Embora não haja tratamento específico para a OI, os medicamentos da classe bisfosfonatos são utilizados com o objetivo de melhorar a qualidade óssea com redução dos eventos de fraturas e ganho na qualidade de vida.

Os bisfosfonatos tem grande importância na melhora da qualidade óssea de portadores de OI. Entretanto, não existem estudos comparando esses tratamentos e seu impacto sobre o sistema GH-IGF e o ligante do RANK e fatores determinantes do crescimento. Há poucos relatos na literatura do impacto dessas medicações nas expressões de *IGF1R* e *RANKL*. Os relatos da literatura se restringem a dosagens séricas de IGF-1 e IGFBP-3, e os poucos que comparam as medicações, estudaram as dosagens de marcadores ósseos, bioquímicos, densitometria óssea e eventos clínicos.

No Brasil, os protocolos atuais utilizam o pamidronato, bisfosfonato de segunda geração. No entanto, estudos com o uso do ácido zoledrônico, bisfosfonato de terceira geração, mostram segurança e efeitos similares, e com a vantagem de reduzir o tempo de permanência hospitalar.

O ácido zoledrônico é infundido em um único dia, com duração da infusão de aproximadamente 50 minutos, enquanto o pamidronato, o ciclo de infusão em nosso serviço se faz em dois dias, com um tempo de administração da medicação de três horas em cada dia. Ao implementar uma medicação com melhor custo-benefício, o ácido zoledrônico permite maior facilidade posológica, com encurtamento do período de permanência hospitalar, melhora da qualidade de vida do paciente, redução dos dias de perda de atividades escolares das crianças e adolescentes e laborais dos responsáveis, e redução dos custos hospitalares.

Também é incerta a repercussão da substituição do pamidronato pelo ácido zoledrônico no sistema GH-IGF-1 e RANKL. Assim, isso traduz a importância desse estudo, com um objetivo original, o que pode possibilitar novos conhecimentos da ação dessas medicações em portadores de OI.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Avaliar e comparar as expressões de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) dos genes dos *IGF1R* e *RANKL* e as concentrações séricas de IGF-1 e IGFBP-3 em pacientes com OI em uso de dois diferentes tipos de bisfosfonatos: pamidronato ou ácido zoledrônico, sendo um estudo da influência de um e dois ciclos dessas medicações.

2.2 Objetivos secundários

- ✓ Descrever e comparar em um corte transversal os tipos de OI quanto as seguintes variáveis: Estatura, Índice de Massa Corpórea (IMC), expressões gênicas de RNAm de *IGF1R* e *RANKL*, dosagens séricas de IGF-1, IGFBP-3, CTX e osteocalcina.
- ✓ Descrever e comparar em um corte transversal o grupo de indivíduos com OI que apresentam a forma leve da doença versus o grupo de indivíduos que apresentam as formas moderadas e graves, quanto as seguintes variáveis: Estatura, Índice de Massa Corpórea (IMC), densidade mineral óssea, expressões gênicas de RNAm de *IGF1R* e *RANKL*, dosagens séricas de IGF-1, IGFBP-3, osteocalcina, CTX, cálcio total, magnésio, fósforo inorgânico, albumina, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP).
- ✓ Descrever e comparar em um estudo longitudinal, com os indivíduos randomizados em dois grupos, um em uso de pamidronato e outro em uso de ácido zoledrônico, as variáveis osteocalcina e CTX. Essa avaliação aconteceu em relação a influência de um e dois ciclos de bisfosfonatos.

Casuística e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS:

3.1 Tipo de estudo

Esse é um estudo experimental transversal e longitudinal dividido em 3 partes. A primeira parte representou análises transversais e as demais partes (2 e 3), análises longitudinais. É importante salientar que esse trabalho não é um ensaio clínico, uma vez que o foco da investigação não foi segurança e eficácia de tratamentos, nem mesmo efetuou-se intervenções contra as doenças e problemas de saúde de qualquer natureza. Também não se avaliou os efeitos farmacológicos, farmacocinéticos e farmacodinâmicos de novas terapias, uma vez que ambas as medicações são utilizadas em protocolos clínicos de tratamentos desses pacientes.

3.2 População do estudo

Crianças e adolescentes com diagnóstico clínico de OI, em uso da medicação pamidronato que acompanham no Ambulatório de Doenças Ósseas Metabólicas Infantis (ADOMI) do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP).

3.2.1 Critérios de inclusão no estudo

Os pacientes portadores de OI precisavam preencher os seguintes critérios: ter mais de 3 anos de idade cronológica, pelo menos 1 ano de tratamento com pamidronato, uso da medicação em regime de Hospital Dia (não foram incluídos os que faziam uso da medicação em regime de internação na enfermaria de pediatria), concordar com a participação no estudo e assinar os termos de consentimento livre e esclarecido (assinado pelos responsáveis do menor) e de assentimento (assinados pelas crianças e adolescentes).

3.2.2 Critérios de Exclusão do estudo

Como o estudo foi dividido em 3 partes, os critérios de exclusão estão descritos conforme cada parte do estudo.

3.2.2.1 Critérios de exclusão da parte 1 do estudo (estudo transversal)

Foram considerados como critérios de exclusão: os pacientes que apresentavam outras doenças sistêmicas agudas ou crônicas que pudessem interferir nos parâmetros que foram estudados, uso de medicamentos crônicos como por exemplo corticoides, responsáveis ou

pacientes que solicitaram retirada do projeto e pacientes com dificuldade técnica de punção venosa.

3.2.2.2 Critérios de exclusão das partes 2 e 3 (estudos longitudinais)

Foram considerados os mesmos critérios da parte 1, acrescidos dos seguintes critérios: intercorrências que levam ao atraso do intervalo do bisfosfonato por mais de 24 semanas (aproximadamente seis meses), pacientes que completavam estadiamento puberal G5 (e, portanto, tinham medicação suspensa) e pacientes que perdiam seguimento no serviço.

3.3 Desenho do estudo

No início do estudo, seguiam no ADOMI 41 pacientes com o diagnóstico clínico de OI. Destes, 24 recebiam a medicação pamidronato em regime de hospital dia e foram elegíveis para o estudo. Destes, 23 concordaram em participar do estudo, e preencheram os termos de consentimento livre e esclarecido e termos de assentimento.

Entretanto, dos 23 pacientes, dois precisaram ser excluídos, uma vez que preenchiam os critérios de exclusão. A primeira participante excluída foi uma adolescente do sexo feminino com diagnóstico de OI tipo IV, que precisou ser retirada do projeto, por apresentar processo de desnutrição importante associado a atraso puberal. A outra participante tratava-se de uma criança do sexo feminino, com diagnóstico de OI tipo III, que precisou ser excluída do projeto por ser portadora de doença pulmonar crônica em uso de corticoide sistêmico contínuo. As patologias de base desses pacientes podem impactar no desenvolvimento puberal e no sistema GH-IGF-1, o que pode trazer um viés na interpretação dos dados, e, portanto, reforça a importância de serem excluídos do projeto.

Dos 21 indivíduos participantes do estudo, onze foram do sexo masculino (52,38%). Entre os diagnósticos clínicos, de acordo com a classificação de Sillence, nove apresentavam OI tipo I, quatro OI tipo III e sete OI tipo IV, além de uma criança com diagnóstico de síndrome de Bruck (OI associada a artrogripose congênita). Ao considerar o espectro de gravidade da OI, nove participantes apresentavam forma leve da doença (OI tipo I) e 12 formas moderada e grave (OI tipo III, IV e síndrome de Bruck).

As 21 crianças e adolescentes que preencheram os critérios de inclusão e não preencheram os de exclusão, foram randomizados em 2 grupos, os quais denominaram-se grupo A e grupo B (divisão que serviu para o estudo longitudinal). A descrição da randomização pode ser vista na Tabela 3.

Tabela 3- Descrição de cada indivíduo participante do estudo conforme sexo, tipo de diagnóstico de OI, idade no momento da primeira coleta, estadiamento puberal e o grupo de randomização, Ribeirão Preto, 2021

Indivíduo	Sexo	Diagnóstico OI Tipo	Idade* (anos)	EP	Randomizaçã o
A	F	III	4,5	1	B
B	F	III	6,42	1	B
C	F	III	6,66	1	B
D	F	III	8	1	A
E	M	IV	3,25	1	B
F	F	IV	6,42	1	A
G	F	IV	6,92	1	B
H	F	IV	12	3	B
I	M	IV	12,33	3	B
J	M	IV	13,83	3	A
K	M	IV	14,75	4	A
L	M	SB	11,75	2	A
M	M	I	5	1	A
N	F	I	5,5	1	B
O	M	I	5,75	1	A
P	F	I	8,42	1	A
Q	M	I	8,58	1	B
R	M	I	9,83	1	B
S	M	I	10,42	2	B
T	F	I	11,58	3	A
U	M	I	14,33	4	A
Média	---	---	8,87	---	---

Nota: OI: Osteogênese imperfeita; EP: estadio puberal; F: Feminino; M: Masculino; SB: Síndrome de Bruck; A: grupo A - randomizado a continuar a receber pamidronato; B: grupo B - randomizado para a troca do pamidronato pelo ácido zoledrônico

*Idade no momento do primeiro tempo de coleta

Realizados cinco tempos de coleta de cada participante, com intervalo aproximado de quatro meses entre cada coleta (Tabela 4). Os leitos do Hospital Dia são reservados às infusões dos bisfosfonatos todas as quartas-feiras (quando recebem a medicação em um dia) e quartas e quintas-feiras (quando recebem a medicação em dois dias sequenciais). Dessa forma, para infusão da medicação, assim como as coletas, para seguir o intervalo aproximado de quatro meses, conforme o protocolo da medicação, esse intervalo é melhor calculado em semanas, o que leva a um intervalo médio de 17 a 18 semanas entre as análises.

Todas as crianças e adolescentes foram avaliadas pelo pesquisador no dia da infusão da medicação nos cinco tempos de coleta. Nesta ocasião, avaliação clínica-antropométrica e bioquímica foram realizadas. Amostras de sangue para determinação de expressão de *IGF1R* e *RANKL*, IGF-1, IGFBP-3 e marcadores de metabolismo ósseo (CTX e osteocalcina) foram obtidas imediatamente antes da infusão da medicação. Realizada avaliação antropométrica e

estadiamento puberal. Abaixo a descrição dos dois grupos randomizados, conforme tempos de coleta de exames e avaliação clínica.

Grupo A: Os pacientes do grupo A receberam medicação pamidronato conforme o protocolo vigente (ANEXO A), realizadas análises nos tempos 1, 2, 3, 4 e 5, o que totalizou um período médio de seguimento de 16 meses. Portanto a avaliação clínica e laboratorial se fez em relação à medicação pamidronato.

Grupo B: Nos pacientes do grupo B, houve troca da medicação pamidronato por ácido zoledrônico no tempo 3, e, portanto, a análise dos parâmetros nos tempos 1, 2 e 3 (oito primeiros meses) foram sob efeito da medicação pamidronato (conforme protocolo vigente), e dos tempos 4 e 5 (oito meses finais) sob efeito da medicação ácido zoledrônico.

Tabela 4 - Descrição das medicações aplicadas nos tempos de coletas de exames e avaliação clínica, Ribeirão Preto, 2021

Tempos de Coleta	Grupo A	Grupo B
1 (+- 0 meses)	Pamidronato	Pamidronato
2 (+- 4 meses)	Pamidronato	Pamidronato
3 (+- 8 meses)	Pamidronato	Ácido zoledrônico*
4 (+- 12 meses)	Pamidronato	Ácido zoledrônico
5 (+- 16 meses)	Pamidronato	Ácido zoledrônico

* Como a medicação era aplicada imediatamente após a coleta e avaliação clínica, embora no tempo 3 o grupo B tenha recebido ácido zoledrônico, a avaliação clínica-laboratorial se deu em relação à influência do pamidronato (medicação do ciclo anterior)

3.3.1 Parte 1 do estudo: estudo transversal

Estudo transversal dos pacientes em uso de pamidronato que preencheram os critérios de inclusão e não preencheram os de exclusão. Em geral, essa parte do estudo correspondeu a análise clínica e laboratorial das coletas do primeiro tempo de cada paciente. Como todos os participantes estavam em uso da medicação pamidronato, realizou-se análise agrupando-os conforme o tipo de OI e a gravidade da doença que apresentavam, e conforme o estadiamento puberal. Nessa etapa de análise não se utilizou os grupos randomizados.

3.3.2 Parte 2 do estudo: Análise dos parâmetros sobre influência de um ciclo de Bisfosfonatos diferentes

Estudo longitudinal, no qual avaliou-se a influência de um ciclo da medicação bisfosfonato sobre os parâmetros analisados. Portanto, essa foi uma fase do estudo com menor duração, com duas coletas, com intervalo aproximado de quatro meses ou entre 17-18

semanas. Nessa etapa do estudo, utilizou-se os grupos randomizados (descritos acima), em que no grupo A avaliou-se os pacientes em uso de pamidronato, e o grupo B, os pacientes em uso de ácido zoledrônico, sob efeito da primeira administração da medicação, no caso desse último grupo. As análises foram referentes às coletas dos tempos 3 e 4.

3.3.3 Parte 3 do estudo: Análise dos parâmetros sobre a influência de dois ciclos de Bisfosfonatos diferentes

Estudo longitudinal, no qual avaliou-se a influência de dois ciclos da medicação bisfosfonato sobre os parâmetros analisados. Portanto, essa foi uma fase do estudo com tempo médio de seguimento de cada paciente de oito meses, no qual foram coletados exames séricos em três tempos (correspondeu às coletas dos tempos 3, 4 e 5). Nessa etapa do estudo, também se utilizou os grupos randomizados (descritos acima), em que no grupo A avaliou-se os pacientes em uso de pamidronato, e o grupo B, os pacientes sob efeito de duas doses da medicação ácido zoledrônico.

As variáveis clínicas e laboratoriais analisadas nas três partes do estudo, estão descritas no item 3.5.

3.4 Protocolos das medicações bisfosfonatos

O pamidronato e o ácido zoledrônico são drogas liberadas para outras doenças ósseas no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP). O pamidronato faz parte do protocolo de tratamento dos pacientes com OI desde o reconhecimento do HC-FMRP-USP como centro de referência de tratamento. O medicamento ácido zoledrônico é utilizada para tratamento de OI em alguns centros no mundo, como no *Shriners Hospital for Children*, Montreal - Quebec - Canadá.

Utilizado como critério de indicação do uso da medicação presença de fraturas recorrentes sem que haja energia mecânica suficiente para provocar fratura, com a presença de pelo menos 2 fraturas de ossos longos de baixo trauma até os 10 anos de idade ou ao menos 3 fraturas de ossos longos de baixo trauma até os 18 anos de idade. Também utilizamos como critérios de indicação da medicação, a presença de qualquer fratura vertebral, independente do resultado do escore-Z no sítio da coluna lombar na densitometria óssea (DXA) ou exame de DXA com escore-Z em sítio de coluna lombar com resultado inferior a - 2.

Utilizado como critério de indicação de término de tratamento, e, portanto, interrupção do uso da medicação, o momento em que os pacientes atingem estadiamento puberal 5 (G5 ou M5).

É importante ressaltar que o tratamento pode ser interrompido transitoriamente quando há presença de fraturas (o que leva a um atraso de um mês na próxima infusão da medicação, em uma recomendação do serviço HC-FMRP-USP) ou cirurgias com colocação de hastes (que leva a um atraso de quatro meses na próxima infusão da droga).

3.4.1 Protocolo com a medicação Pamidronato (protocolo vigente no serviço)

No protocolo do Ministério da Saúde o bisfosfonato padronizado é o uso da medicação pamidronato. A medicação é usada em uma dose anual de 9 mg/kg, fracionada em ciclos que são realizados em períodos a cada dois a quatro meses a depender da idade (menores de dois anos: ciclos a cada dois meses; entre dois e três anos: ciclos a cada três meses; acima de três anos: ciclos a cada quatro meses) e cada ciclo é realizado em três dias (Portaria SAS/MS nº 1.306, de 22 de novembro de 2013).

No protocolo do serviço do HC-FMRP-USP, o protocolo do Ministério da Saúde foi adaptado para administração da mesma dose da medicação por ciclo, mas com redução para dois dias em cada ciclo, em que o pamidronato é usado na dose de 1,5 mg/kg/dia por dois dias, a cada quatro meses para pacientes acima de três anos de idade, o que leva a uma dose anual de 9 mg/kg, que é igual à do protocolo do Ministério da Saúde. Em cada dia de medicação, a infusão se dá em um período de três horas (ANEXO A). O paciente recebe a medicação em regime de hospital dia, com permanência hospitalar apenas no momento de infusão da droga.

3.4.2 Protocolo com a medicação Ácido Zoledrônico (protocolo proposto para o serviço)

O protocolo instituído do ácido zoledrônico foi adaptado do protocolo utilizado pela equipe do *Shriners Hospital for Children*, Montreal - Quebec - Canadá. No protocolo original, o ácido zoledrônico se faz a cada seis meses. Para permitir uma comparação entre os grupos do estudo, o protocolo do serviço foi adaptado, para que os pacientes pudessem receber a mesma dose anual da medicação, mas com a mesma administrada a cada quatro meses. O ácido zoledrônico permite maior facilidade posológica, encurtando o período de internação, onde cada ciclo é infundido em um único dia, com duração da infusão por aproximadamente 50 minutos (ANEXO B).

3.5 Variáveis analisadas

Foram avaliadas as seguintes variáveis: expressão de RNAm de *IGF1R* e *RANKL* em leucócitos periféricos, dosagens séricas de IGF-1, IGFBP-3, osteocalcina, CTX e marcadores bioquímicos. As coletas foram realizadas antes da infusão da medicação, com retirada de aproximadamente 5 ml de sangue, e a mesma punção foi destinada ao acesso venoso para infusão do medicamento, o que não aumentou o número de punções que iria receber. As amostras foram armazenadas a -80°C para futuras mensurações dos parâmetros: expressão gênica de *IGF1R* e *RANKL*, IGF-1, IGFBP-3, CTX, osteocalcina e marcadores bioquímicos. Todas as análises das variáveis foram realizadas após a última coleta programada do trabalho.

Foram avaliados os aspectos clínicos: eventos de fraturas e dados antropométricos (peso, estatura, velocidade de crescimento, índice de massa corpórea) e estadiamento puberal.

3.5.1 Avaliação antropométrica, estadiamento puberal e eventos clínicos

A aferição do peso foi realizada em balança digital e a aferição estatural em estadiômetro vertical, nos pacientes que conseguiam ficar em pé. Nos pacientes cadeirantes, que não conseguem tomar a posição ortostática adequada, realizada aferição deitado em superfície rígida com uso de régua de aferição de comprimento. Aferição do peso realizada em quilogramas (Kg) e estatura em centímetros (cm) (técnica preconizada por Frisancho em 1990). Os dados foram utilizados para cálculo do índice de Massa Corpórea (IMC), definido pela relação da massa corporal em quilos dividido pela estatura em metros elevada ao quadrado (Kg/m^2). Os dados foram ajustados para sexo e idade, usou-se aplicativo de curvas da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2007 (WHO, 2007), plotados na curva populacional de peso, estatura e IMC da OMS, com resultados em escore-Z. O estadiamento puberal foi avaliado de acordo com os critérios estabelecidos por Marshall e Tanner.

3.5.2 Densitometria óssea

Também foi avaliada a massa óssea de cada indivíduo pela realização da densitometria óssea (DXA), que faz parte dos exames de seguimento desses pacientes. O exame foi realizado conforme protocolo, em que se respeitou a agenda de marcação do serviço, no decorrer dos tempos de coleta, considerados os exames realizados após a coleta do tempo 1. Foi avaliado sítio ósseo da coluna lombar – vértebras lombares 1-4 (L1-L4) de cada paciente, por meio da técnica de raio-X de dupla energia (DXA) em aparelho da marca Hologic (Discovery Wi, QDR series, Waltham, MA, USA), com resultado da densidade mineral óssea

apresentado em escore padrão (escore-Z) para idade e sexo. O exame foi realizado nos meses seguintes a coleta do tempo 1 do estudo.

3.5.3 Análise da expressão gênica de *IGF1R* e *RANKL*

As expressões dos genes dos *IGF1R* e *RANKL* foram realizadas mediante extração e quantificação de RNA, com posterior síntese de Ácido Desoxirribonucleico complementar (cDNA) e realização da reação em cadeia de Polimerase em tempo real (qRT-PCR).

3.5.3.1 Processamento das amostras de sangue periférico

Para o processamento da amostra de sangue periférico, elas foram submetidas a um processo de hemólise com cloreto de amônio e bicarbonato de amônia na proporção 9:1, respectivamente. Em um falcon de 50, colocado sangue periférico e completado com cloreto de amônio/bicarbonato de amônia para 25 ml. O falcon foi colocado no gelo e aguardou a lise das hemácias com homogeneização periódica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos em uma temperatura de 4°C. Enquanto centrifugava, identificados 2 tubos tipo *ependorfs* com número da amostra e data da coleta. Após centrifugação, descartado sobrenadante e ressuspendido o pellet em 750 µl de tampão fosfato-salino (PBS), o qual foi 1 vez tratado com dietilpirocarbonato (DEPC). Em 250 µl de suspensão, foi adicionado 750 µl de TRIzol LS Reagent®, e o conteúdo foi homogeneizado. Descartado o sobrenadante dos tubos tipo *ependorfs* e retirado o PBS do pellet o máximo possível. Estocadas as alíquotas a -80°C para posterior extração de RNA.

3.5.3.2 Extração do RNA

Foi utilizado TRIzol LS Reagent® (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA) para isolar o RNA total dos *pellets* de leucócitos. As amostras foram descongeladas, homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck, AL) e homogeneizados vigorosamente por quinze segundos, e posteriormente incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C.

O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa incolor nesse sistema, que foi retirado com cuidado, evitada a interface, e transferido para um novo tubo. Ao novo tubo foram adicionados 500 µl de álcool isopropílico a 100% (Merck, AL) e homogeneizado por inversão. As amostras foram incubadas *overnight* a -20°C. Após esse tempo, elas foram submetidas a centrifugação por 20 minutos a 13.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi

desprezado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 75% por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de RNA foi seco a temperatura ambiente e novamente suspenso em 30 µl de água de água ultrapura e estocados a -80°C.

3.5.3.3 Quantificação do RNA

O aparelho *NanoDrop Spectrophotometer* (Thermo Scientific, DE, EUA) avaliou a concentração e pureza do RNA total. A razão dos valores de absorbância A260/A280 fornece o padrão de qualidade para o teste de pureza do RNA e esse deve ser aproximadamente 2,0. Outro indicador de pureza é a relação A260/A230 que deve ser de aproximadamente 2,2. Uma razão A260/A230 inferior a 1,8 indica níveis significativos de contaminantes orgânicos, tais como hidratos de carbono, peptídeos, fenol e TRIzol, que absorvem luz a 230 nm.

3.5.3.4 Síntese de cDNA

As amostras de RNA total foram utilizadas para a síntese do DNA complementar (cDNA). O RNA total (500 ng) foi reversamente transcrito com os reagentes do *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA, #Cat.4368814), padronizado para uma reação: 2,5 µl de 10X RT Buffer, 1 µl de 25X dNTP Mix (100 nM), 0,63 µl de RNase Out, 1,25 µl de MultiScribeR Reverse Transcriptase (50 U/µl) (MultiScribe™ MuLV) e 2,5 µl de primer randômico (oligonucleotídeo iniciador). O volume final da reação foi equalizado com água pura para 25 µl.

3.5.3.5 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

As amostras foram diluídas 1:20 e cada uma amplificada em duplicata. Consideradas para análise as amostras cujo valor de desvio padrão não excedeu 0,5. Foi utilizado o método de quantificação relativa, o qual sinaliza a mudança de expressão do gene alvo em relação ao calibrador escolhido. Para expressão dos genes, foram utilizadas as sondas TaqMan *IGF1R* (HS00609566_m1) e *RANKL* (Hs00243522_m1) e como controle endógeno foi utilizado a média geométrica da expressão do gene *GUSB* (4326320E) e *B2M* (4326319E) obtidas para cada amostra. A expressão de uma amostra controle foi utilizada como calibrador e a quantificação relativa foi calculada pela fórmula 2-delta delta TC (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.5.4 Análise sérica de IGF-1 e IGFBP-3

Os valores de IGF-1 e IGFBP-3 foram determinados pelo método de quimioluminescência (Immulite 2.000, Siemens, Los Angeles, CA, EUA). O coeficiente intra-

ensaio de variação para IGF-I foi de 2,4% e do IGFBP-3 2,3%. A sensibilidade do ensaio para IGF-I foi de 5 ng/ml e do IGFBP-3 foi de 100 ng/ml.

3.5.5 Análise sérica de CTX, Osteocalcina e marcadores bioquímicos

Os valores de CTX foram determinados pelo método Elisa-Elabscience (lote: 6MW9R5YSE5), com coeficiente de variação de 6,08. Os valores de Osteocalcina foram determinados pelo método de quimioluminescência automatizada com o aparelho LIAISON XL, DiaSorin, número de série: 2210002627.

Os valores dos marcadores bioquímicos, cálcio sérico total, fósforo inorgânico, magnésio, fosfatase alcalina, albumina, TGO, TGP, ureia e creatinina foram determinados no Laboratório Central do HC-FRMP-USP, em aparelho analisador bioquímico automático (KONELAB 60i, Wiener, Thermo Clinical Labsystem ou Ruukintie, Espoo, Finlândia).

3.6 Banco de dados e armazenamento

Programou-se o armazenamento das amostras por um período de aproximadamente 2 anos após a conclusão desse estudo, com o objetivo de servir de banco de dados para novas análises de estudos que vierem posteriormente. Após esse período está programado o descarte das amostras.

3.7 Análise estatística

Os valores antropométricos foram apresentados em valores escore padrão (escore-Z), utilizou-se como referência curva populacional da OMS. Calculado IMC dos pacientes com resultado apresentados em escore-Z e também se utilizou curvas de referência da OMS (WHO, 2007).

Os resultados de IGF-1 e IGFBP-3 foram representados em valores absolutos e em escore-Z (ajustado pelo estadiamento puberal, conforme referências dos kits fornecidos). A expressão relativa de *IGF1R* e *RANKL* foram determinadas pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Correlações entre as variáveis de interesse (*IGF1R*, *RANKL*, IGF-1, IGFBP-3 e osteocalcina), considerando as medidas repetidas em cada indivíduo, foi medida por meio do coeficiente de correlação de Bland-Altman. Para a comparação de 3 grupos (OI tipo I vs OI tipo III vs OI tipo IV e Sd de Bruck) entre as variáveis não paramétricas, utilizou-se análise de variâncias por postos de Kruskal Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dun. O software utilizado foi o SPSS 23.0. Para comparação de 2 grupos (formas leves vs formas moderadas e graves) frente às variáveis de interesse, em relação às médias dos escores-z de

estatura, IMC, DMO, IGF-1 e IGFBP-3, marcadores ósseos e bioquímicos foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O software utilizado foi o SAS 9.4 e R.4.0.2.

Para análise do estudo longitudinal, foram consideradas as diferenças entre os momentos de cada medida (deltas). Para se estimar as diferenças entre as médias dos grupos, foram ajustados modelos lineares de efeitos mistos sob abordagem Bayesiana, obtendo-se as estimativas e seus respectivos intervalos de credibilidade 95%. A sua interpretação é a de que a probabilidade da verdadeira diferença entre as médias dos grupos, na população, estar entre os limites superiores e inferiores do Intervalo de Credibilidade, é de 95% (ICr95%). Foi utilizado o pacote R2jags do software R 4.0.2.

3.8 Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC-FMRP-USP e aprovado em 04/01/2017 (Número do parecer: 1.887.374). Houve um reajuste do projeto devido a questões orçamentárias e atraso no andamento, com nova versão submetida no CEP, com aprovação em 06/07/2020 (número do parecer: 4.136.958) (ANEXO C). Obtido Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos pais ou responsáveis legais e Termo de Assentimento (TA) de todas as crianças e adolescentes que participaram do estudo, após receberem explicação verbal detalhada (APÊNDICE A e B).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Descrição de cada indivíduo conforme suas características clínicas e intercorrências por tempo de coleta

Nas páginas abaixo, há a descrição de um resumo da história clínica das crianças participantes do estudo, com relatos da idade do diagnóstico da OI, história pregressa de fraturas e procedimentos ortopédicos como implante de hastes telescópicas.

Relato de cada indivíduo, quanto a idade de início do pamidronato ocorrido previamente ao começo desse estudo. Descrição do estadiamento puberal na primeira avaliação clínica e o grupo para qual cada um foi randomizado. Também descreve as intercorrências apresentadas por cada participante no decorrer do estudo longitudinal.

As tabelas que seguem a descrição de cada indivíduo, trazem os resultados das variáveis nos cinco tempos de coletas. A idade está representada em anos. O IMC e a estatura em escore-Z calculados pela idade e sexo. IGF-1 e IGFBP-3 em escore-Z calculados pelo estadiamento puberal e sexo. E a osteocalcina relatada em valores absolutos.

4.1.1 Indivíduo A

Criança do sexo feminino, apresentou múltiplas fraturas ao nascimento. Iniciou pamidronato com 10 dias de vida. Após início do pamidronato, apresentou dois episódios de fratura em fêmur direito, com instalação de haste telescópica, e fraturas de úmeros bilateralmente.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo III. Randomizado para o grupo B (ácido zoledrônico). Idade cronológica de quatro anos e seis meses no primeiro tempo de coleta. Houve um atraso entre o primeiro e segundo tempo, uma vez que não compareceu as datas de agendamento e reagendamento programados.

Durante o período do estudo, apresentou fratura de tíbia e úmero esquerdos entre o segundo e terceiro tempo, nova fratura de úmero esquerdo entre o terceiro e quarto tempo. Instalação de hastes em tíbia direita e esquerda, o que levou a um atraso de quatro semanas na realização do quinto tempo, mas não prejudicou a análise.

Tabela 5 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo A em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	4,5	5,25	5,58	5,92	6,33
Estatura em cm (escore-Z)	76,5 (-6,58)	78 (-6,78)	79 (-6,79)	80 (-6,83)	83,5 (-6,43)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	14,69 (-0,39)	14,27 (-0,7)	14,42 (-0,58)	14,36 (-0,62)	14,44 (-0,58)
IGF1R em 2^{-ΔACT}	---	---	1,64695	1,79524	2,45221
RANKL em 2^{-ΔACT}	---	---	1,09832	0,79151	0,97880
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	68,7 (-2,15)	---	104 (-1,65)	105 (-1,64)	121 (-1,41)
IGFBP-3 em μg/ml (escore-Z)	1,83 (-2,16)	---	2,52 (-1,36)	2,28 (-1,64)	2,69 (-1,16)
CTX em ng/ml	<0,16	---	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	32,5	---	34,2	26,5	32,1

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type 1*.

Tempo 1: Não foi possível realização de expressão gênica de RNAm de IGF1R e RANKL, uma vez que não conseguiu amplificação da amostra para PCR em tempo real.

Tempo 2: não conseguiu coleta devido a dificuldades técnicas.

4.1.2 Indivíduo B

Criança do sexo feminino, mostrou deformidades ósseas em ultrassom gestacional e múltiplas fraturas intrauterinas em úmeros, fêmures, tíbias e antebraços. Foi encaminhada ao serviço de endocrinologia pediátrica do HC-FMRP, onde foi indicado tratamento com pamidronato. Recebeu primeiro ciclo da medicação com um mês e seis dias de vida. Continuou a apresentar fraturas no decorrer dos anos com necessidade de instalação de hastes telescópicas em fêmures e tíbia direita.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo III. Randomizado para o grupo B. Idade cronológica de seis anos e cinco meses no primeiro tempo de coleta. Realizados cinco tempos de coleta, apresentou fratura de fêmur esquerdo entre o terceiro e quarto tempo de coleta, o que atrasou a administração da medicação no quarto tempo.

Tabela 6 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo B em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	6,42	6,75	7,25	7,67	8
Estatura em cm (escore-Z)	92,5 (-4,77)	94 (-4,75)	96 (-4,75)	97 (-4,92)	99 (-4,81)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	13,90 (-0,98)	14,31 (-0,69)	14,43 (-0,67)	14,4 (-0,76)	14,79 (-0,55)
IGF1R em 2^{-AACT}	1,42002	2,14861	1,69676	1,79398	2,13428
RANKL em 2^{-AACT}	0,81938	1,12148	0,94264	0,81037	1,39257
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	120 (-1,43)	118 (-1,46)	150 (-1,01)	117 (-1,47)	160 (-0,87)
IGFBP-3 em µg/ml (escore-Z)	4,05 (0,40)	4,49 (0,91)	4,42 (0,83)	4,22 (0,60)	5,11 (1,63)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	0,22	0,5	0,42
Osteocalcina em ng/ml	34,0	29,5	27,9	30	36,5

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.3 Indivíduo C

Criança do sexo feminino. Triagem no serviço aos 19 dias de vida, com história fratura de sétimo arco costal direito, calo ósseo em rádio direito, arqueamento de rádio esquerdo, fratura de úmero esquerdo, deformidades ósseas ao nascimento. Fratura de fêmur com oito dias de idade. Indicado tratamento com pamidronato com primeiro ciclo recebido aos 24 dias de vida. Apresentou, aproximadamente, 34 fraturas do nascimento ao término do estudo. Possui hastes telescópica em fêmures e tíbias bilateralmente.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo III. Randomizado para o grupo B. Idade cronológica de seis anos e oito meses, no momento do primeiro tempo de coleta. Apresentou uma fratura de membro superior direito (úmero) e retirou haste metálica de membro inferior direito com reosteossíntese do fêmur direito com haste telescópica, entre o primeiro e segundo tempos de coletas. Isso levou a atraso de 44 semanas entre os dois períodos.

Não conseguiu realizar coleta pelas dificuldades anatômicas no segundo tempo. Sem sucesso na coleta do quinto tempo, devido ao período pandêmico de Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).

Tabela 7 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo C em cada tempo do estudo Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	6,66	7,6	7,83	8,08	---
Estatura em cm (escore-Z)	94 (-4,66)	95 (-5,1)	96 (-5,16)	96,5 (-5,28)	---
IMC em Kg/m² (escore-Z)	19,35 (1,92)	19,9 (1,93)	18,77 (1,86)	20,45 (1,94)	---
IGF1R em 2^{-AACT}	1,58102	---	2,05008	1,20734	---
RANKL em 2^{-AACT}	1,84594	---	0,51057	0,87438	---
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	109 (-1,58)	---	98,1 (-1,74)	158 (-0,9)	---
IGFBP-3 em µg/ml (escore-Z)	2,92 (-0,9)	---	3,53 (-0,2)	3,75 (0,06)	---
CTX em ng/ml	<0,16	---	<0,16	<0,16	---
Osteocalcina em ng/ml	53,9	---	40,9	36,1	---

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

Tempo 2: Não conseguiu coleta devido a dificuldades técnicas.

Tempo 5: Não foi realizada coleta devido à crise pandêmica de COVID-19.

4.1.4 Indivíduo D

Criança do sexo feminino. Triagem no HC-FMRP aos 22 dias de vida, com ultrassom morfológico sugestivo de encurvamento de membros inferiores e membros superiores curtos. Ao nascimento apresentou insuficiência respiratória por restrição de caixa torácica. Em radiografias após o nascimento, observados calos ósseos em arcos costais, úmeros, ulnas e fêmures bilateralmente. Indicado tratamento com pamidronato, recebeu primeiro ciclo da medicação aos 29 dias de vida. Fraturas recorrentes no decorrer dos anos. Presença de hastes telescópicas em fêmures e tíbias bilateralmente e úmero direito.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo III. Randomizado para o grupo A (pamidronato). Idade cronológica de oito anos no momento do primeiro tempo de coleta. O segundo tempo foi adiado, uma vez que passou por cirurgia de colocação de haste em membro superior (úmero) direito, o que gerou um intervalo de 31 semanas entre esses ciclos. Também houve atraso entre o quarto e o quinto tempos para readequação de haste em membro superior direito.

Tabela 8 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo D em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	8	8,67	9	9,42	9,92
Estatura em cm (escore-Z)	94 (-5,67)	98 (-5,41)	100 (-5,33)	104,5 (-4,9)	112 (-4,35)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	19,8 (1,75)	19,7 (1,56)	21 (1,86)	20,6 (1,65)	20,16 (1,31)
IGF1R em 2^{-AACT}	0,03316	1,68761	2,28099	1,36956	1,68500
RANKL em 2^{-AACT}	0,78252	1,15908	1,11586	0,65757	1,28677
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	153 (-0,96)	191 (-0,43)	233 (0,15)	244 (0,3)	195 (-0,38)
IGFBP-3 em µg/ml (escore-Z)	1,95 (-2,02)	2,16 (-1,77)	2,57 (-1,3)	2,76 (-1,08)	2,65 (-1,2)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	37,8	35,8	37,8	45,1	29,1

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.5 Indivíduo E

Criança do sexo masculino, primeira fratura em fêmur esquerdo logo após o nascimento. Última fratura ocorrida antes do início do estudo. Indicado pamidronato com primeiro ciclo aos dois meses e 20 dias de vida.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo IV. Randomizado para o grupo B. Idade cronológica de três anos e três meses no momento do primeiro tempo de coleta, participante com menor idade cronológica do estudo. Houve um atraso para realização do tempo 2, pois perderam seguimento no serviço com faltas recorrentes às datas agendadas para a medicação, o que ocasionou intervalo de 50 semanas entre os dois primeiros tempos. Mãe alegava problemas saúde por parte dela, o que prejudicou o acesso à medicação pelo menor.

Tabela 9 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo E em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	3,25	4,25	4,5	4,83	5,17
Estatura em cm	86,5	92	94	95,5	97,5
(escore-Z)	(-3,07)	(-3,03)	(-2,95)	(-3,00)	(-2,94)
IMC em Kg/m²	15,97	15,59	15,73	15,84	15,77
(escore-Z)	(0,37)	(0,24)	(0,37)	(0,47)	(0,39)
IGF1R em 2^{-ΔΔCT}	2,40734	1,34857	1,62547	1,51695	1,56993
RANKL em 2^{-ΔΔCT}	4,34676	1,05477	0,91216	0,93541	2,35006
IGF-1 em ng/ml	67,2	56	72,6	88,8	94,2
(escore-Z)	(-2,42)	(-2,75)	(-2,26)	(-1,79)	(-1,63)
IGFBP-3 em µg/ml	2,91	2,86	3,21	3,33	4,02
(escore-Z)	(-0,85)	(-0,93)	(-0,38)	(-0,19)	(0,90)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	28,5	30	29,7	29,1	30,6

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.6 Indivíduo F

Criança do sexo feminino, com história de fratura de fêmur bilateral no primeiro dia de vida. Fraturas de tíbia e fêmur no segundo ano de vida. Indicado tratamento com pamidronato, início com um ano e sete meses de idade. Não possui hastes telescópicas.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo IV. Randomizado para o grupo A. Idade cronológica de seis anos e cinco meses no momento do primeiro tempo de coleta. Não apresentou intercorrências, e conseguiu completar os cinco tempos dentro dos limites de prazos estabelecidos.

Tabela 10 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo F em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	6,42	6,75	7,08	7,42	7,75
Estatura em cm (escore-Z)	104,5 (-2,48)	106 (-2,49)	108 (-2,43)	109 (-2,53)	110,5 (-2,58)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	16,89 (0,89)	16,64 (0,72)	16,80 (0,75)	17,50 (1,02)	18,18 (1,23)
IGF1R em 2^{-AACT}	1,72395	1,46518	1,73659	2,77190	2,05134
RANKL em 2^{-AACT}	0,90233	0,32445	0,45890	0,52245	0,81454
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	183 (-0,55)	134 (-1,23)	178 (-0,62)	206 (-0,22)	202 (-0,28)
IGFBP-3 em µg/ml (escore-Z)	3,98 (0,32)	3,83 (0,14)	4,54 (0,97)	5,03 (1,53)	5,04 (1,55)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	43,7	32,7	39,3	39,5	37,3

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.7 Indivíduo G

Criança do sexo feminino, nascida no HC-FMRP. Ao nascimento, observada presença de ossos longos curtos e curvatura femoral acentuada. Fratura de úmero direito aos dois meses, fêmur direito aos nove meses e fêmur esquerdo aos 11 meses de vida. Indicado tratamento com pamidronato, recebeu o primeiro ciclo da medicação com um ano e dois meses de idade. Apresentou 18 fraturas do nascimento ao término do estudo. Possui hastes telescópicas em fêmures e tíbias bilateralmente.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo IV. Randomizado para o grupo B. Idade cronológica de seis anos e 11 meses, no momento do primeiro tempo de coleta. Houve atraso na realização dos tempos 2 e 3, devido a fratura e troca de haste telescópica da tíbia direita entre os tempos 1 e 2.

Apresentou, também, fratura peri-implante e revisão de haste telescópica em fêmur direito entre o segundo e o terceiro tempos. Essas intercorrências levaram a um intervalo de 36 semanas entre o primeiro e segundo tempos, e 32 semanas entre o segundo e o terceiro tempos.

Tabela 11 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo G em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	6,92	7,58	8,25	8,5	8,83
Estatura em cm	111	114,5	117	119	120,5
(escore-Z)	(-1,77)	(-1,77)	(-1,90)	(-1,82)	(-1,86)
IMC em Kg/m²	16,76	16,43	16,29	16,52	16,87
(escore-Z)	(0,75)	(0,47)	(0,27)	(0,32)	(0,41)
IGF1R em 2^{-ΔΔCT}	1,45959	1,51844	1,37460	2,88562	2,50619
RANKL em 2^{-ΔΔCT}	0,98662	0,32121	0,42884	0,72567	0,93109
IGF-1 em ng/ml	178	170	226	201	259
(escore-Z)	(-0,62)	(-0,73)	(0,06)	(-0,29)	(0,52)
IGFBP-3 em µg/ml	3,18	3,04	3,94	3,73	4,45
(escore-Z)	(-0,60)	(-0,76)	(0,28)	(0,03)	(0,87)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	0,18	0,27
Osteocalcina em ng/ml	56,7	39,6	56,5	39,8	40,4

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.8 Indivíduo H

Púbere do sexo feminino. Triagem no HC-FMRP aos dois anos e quatro meses, com história de fratura recorrente de fêmur direito com primeiro episódio aos 17 dias de vida. Indicado tratamento com pamidronato, recebeu o primeiro ciclo da medicação com dois anos e oito meses.

Apresentou novas fraturas em fêmures e úmero direito. Última fratura em punho direito ocorreu antes do início do estudo. Portadora de haste-intramedular telescópavel em fêmures esquerdo e direito instalada antes do início do estudo.

Estadiamento puberal 3, com diagnóstico de OI tipo IV, com diagnóstico realizado no período neonatal. Randomizada para o grupo B. Idade cronológica de 12 anos no momento do primeiro tempo de coleta. Não apresentou intercorrências e conseguiu completar os cinco tempos nos prazos estabelecidos.

Tabela 12 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo H em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	12	12,42	12,67	13	13,33
Estatura em cm	115,5	118,5	119,5	121	123
(escore-Z)	(-5,28)	(-5,12)	(-5,16)	(-5,14)	(-5,02)
IMC em Kg/m²	17,54	16,73	16,95	17,75	18,41
(escore-Z)	(-0,23)	(-0,75)	(-0,74)	(-0,47)	(-0,28)
IGF1R em 2^{-ΔΔCT}	1,61116	2,16532	1,14340	1,61255	2,94821
RANKL em 2^{-ΔΔCT}	0,64981	0,42590	0,50956	0,60170	0,39717
IGF-1 em ng/ml	309	330	393	347	412
(escore-Z)	(-0,42)	(-0,01)	(1,26)	(0,34)	(1,64)
IGFBP-3 em µg/ml	5,28	5,19	6,07	5,81	5,83
(escore-Z)	(-0,53)	(-0,62)	(0,21)	(-0,37)	(-0,35)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	45,8	63,7	69,6	59,6	52,6

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.9 Indivíduo I

Púbere do sexo masculino, com triagem no serviço com cinco meses e 18 dias de vida, apresentou ao nascimento fraturas de úmero direito e clavícula direita. Fratura de fêmur direito aos dois anos de idade e perna direita aos três anos e dois meses. Foi indicado tratamento com pamidronato, recebeu o primeiro ciclo da medicação aos três anos e quatro meses. Apresentou 13 fraturas do nascimento até o término desse estudo.

Estadiamento puberal 3, com diagnóstico de OI tipo IV. Randomizado para o grupo B. Idade cronológica de 12 anos e quatro meses no momento do primeiro tempo de coleta. Apresentou fratura de tíbia direita e foi submetida a cirurgia para colocação de haste telescópica, entre o segundo e terceiro tempo de coleta, o que levou a um intervalo de 38 semanas entre esses dois tempos. Não foi efetuado quinto tempo de coleta devido à pandemia de COVID-19.

Tabela 13 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo I em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	12,33	12,75	13,5	13,75	---
Estatura em cm	121	122	123	126	---
(escore-Z)	(-4,23)	(-4,41)	(-4,85)	(-4,68)	
IMC em Kg/m²	18,37	19,01	20,82	19,40	---
(escore-Z)	(0,27)	(0,41)	(0,84)	(0,23)	
IGF1R em 2^{-ΔΔCT}	0,89087	1,59425	1,34839	0,63084	---
RANKL em 2^{-ΔΔCT}	0,75329	0,52500	0,39756	0,63435	---
IGF-1 em ng/ml	288	276	334	373	---
(escore-Z)	(-0,78)	(-0,99)	(0,04)	(0,74)	
IGFBP-3 em µg/ml	4,98	5,36	5,76	6,65	---
(escore-Z)	(-0,74)	(-0,35)	(0,06)	(0,98)	
CTX em ng/ml	0,18	NHA	0,25	0,21	---
Osteocalcina em ng/ml	54,8	66,5	63,1	93,3	---

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

Tempo 5: Não foi realizada coleta devido à crise pandêmica de COVID-19.

4.1.10 Indivíduo J

Púbere do sexo masculino. Triage no serviço do HC-FMRP aos sete anos de idade com história de fratura de fêmur, no momento do parto, e inúmeras fraturas após o nascimento. Ao longo da vida, apresentou em torno de 10 fraturas. Muitas delas sem traumas importantes, segundo informações do responsável. Foi indicado tratamento com pamidronato, recebeu o primeiro ciclo da medicação aos sete anos e nove meses de idade. Última fratura aos 11 anos e um mês de vida em região de tíbia esquerda.

Estadiamento puberal 3, com diagnóstico de OI tipo IV. Randomizado para o grupo A. Idade cronológica de 13 anos e 10 meses no momento do primeiro tempo de coleta. O segundo tempo de coleta, não foi possível devido a dificuldades técnicas, embora tenha recebido a medicação. Dessa forma, recebeu medicação nos cinco tempos dentro dos limites de prazos estabelecidos.

Tabela 14 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo J em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	13,83	14,17	14,42	14,83	15,08
Estatura em cm	147	148	149	151	152
(escore-Z)	(-1,99)	(-2,14)	(-2,23)	(-2,2)	(-2,25)
IMC em Kg/m²	20,36	21,91	21,95	21,33	19,48
(escore-Z)	(0,58)	(0,98)	(0,92)	(0,62)	(-0,16)
IGF1R em 2^{-AACT}	1,33661	---	1,76880	1,57142	0,78105
RANKL em 2^{-AACT}	0,58889	---	0,28833	0,19952	0,52988
IGF-1 em ng/ml	266	---	335	369	246
(escore-Z)	(-1,17)		(0,06)	(0,67)	(-1,53)
IGFBP-3 em µg/ml	5,02	---	5,84	6,63	5,5
(escore-Z)	(-0,70)		(0,14)	(0,96)	(-0,2)
CTX em ng/ml	<0,16	---	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	52,3	---	59,4	126	92,2

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

Tempo 2: Não conseguiu coleta devido a dificuldades técnicas.

4.1.11 Indivíduo K

Púbere do sexo masculino. Nascido no HC-FMRP, observada presença de encurvamento e encurtamento de membros inferiores, em ultrassonografia morfológica. Aos dois meses de idade, apresentou fratura de fêmur direito. Fratura de fêmur esquerdo aos dois anos de idade, fratura de clavícula aos dois anos e quatro meses.

Indicado pamidronato, recebeu primeiro ciclo da medicação com dois anos e seis meses de idade. Apresentou fraturas recorrentes no decorrer da vida, com sete fraturas entre o nascimento e o início deste estudo.

Estadiamento puberal 4, com diagnóstico de OI tipo IV. Randomizado para o grupo A. Idade cronológica de 14 anos e nove meses no momento do primeiro tempo de coleta. Realizada coleta em apenas três tempos, pois atingiu o estadiamento puberal 5.

Tabela 15 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo K em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	14,75	15,17	15,5	---	---
Estatura em cm (escore-Z)	145,5 (-2,87)	147 (-2,93)	147 (-3,11)	---	---
IMC em Kg/m² (escore-Z)	23,61 (1,31)	24,31 (1,39)	25,79 (1,66)	---	---
IGF1R em 2^{-AACT}	1,02453	1,71196	1,10503	---	---
RANKL em 2^{-AACT}	0,61684	0,50005	0,87423	---	---
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	380 (1,44)	350 (0,86)	310 (0,09)	---	---
IGFBP-3 em µg/ml (escore-Z)	5,19 (-1,39)	5,09 (-1,51)	5,73 (-0,74)	---	---
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	---	---
Osteocalcina em ng/ml	46,8	40,8	41,6	---	---

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; *IGF1R*: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; *RANKL*: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; *IGF-1*: *Insulin-like growth factor 1*; *IGFBP-3*: *Growth hormone binding protein-3*; *CTX*: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

Tempo 4 e Tempo 5: sem análises devido suspensão do protocolo da medicação.

4.1.12 Indivíduo L

Púbere do sexo masculino. Apresentou várias fraturas no parto e no período neonatal (fraturas de arcos costais, fêmur esquerdo e tíbia direita). Iniciado pamidronato com um mês de vida. Última fratura, em fêmur esquerdo com colocação de haste telescópica, aos 10 anos de idade.

Estadiamento puberal 2, com diagnóstico no período neonatal de Síndrome de Bruck (OI associada à artrogrifose). Randomizado para o grupo A. Idade cronológica de 11 anos e nove meses no momento do primeiro tempo de coleta. Não apresentou intercorrências e conseguiu completar os cinco tempos dentro dos limites de prazos estabelecidos.

Tabela 16 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo L em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	11,75	12,08	12,50	12,83	13,17
Estatura em cm	120	121	122	125	128
(escore-Z)	(-3,97)	(-4,07)	(-4,20)	(-4,06)	(-3,94)
IMC em Kg/m²	17,08	17,89	17,80	17,34	18,18
(escore-Z)	(-0,17)	(0,13)	(-0,04)	(-0,39)	(-0,09)
IGF1R em 2^{-AACT}	1,52868	1,43449	1,77957	1,39958	1,78105
RANKL em 2^{-AACT}	0,55125	1,06507	0,26453	0,47797	0,52988
IGF-1 em ng/ml	170	214	208	259	353
(escore-Z)	(-1,47)	(-0,75)	(-0,84)	(-0,01)	(1,53)
IGFBP-3 em µg/ml	3,99	4,95	4,98	5,56	6,05
(escore-Z)	(-0,16)	(1,27)	(1,32)	(2,19)	(2,92)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	72,7	83,9	52,3	61,6	90,2

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth fator 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth fator 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.13 Indivíduo M

Criança do sexo masculino. Primeira fratura, aos dez meses de vida, no punho direito. Após, apresentou fraturas recorrentes em tornozelo, cotovelo, úmero, fíbula e tíbia. A última ocorreu em tíbia direita aos quatro anos e oito meses. Iniciou o pamidronato com três anos e 11 meses de idade.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo I. Randomizado para o grupo A. Idade cronológica de cinco anos no momento do primeiro tempo de coleta. Não apresentou intercorrências e conseguiu completar os cinco tempos dentro dos limites de prazos estabelecidos.

Tabela 17 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo M em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	5	5,33	5,67	6,08	6,33
Estatura em cm (escore-Z)	107,5 (-0,61)	110 (-0,47)	112,5 (-0,38)	114 (-0,51)	116 (-0,45)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	15,79 (0,44)	16,77 (1,07)	17,73 (1,62)	18,15 (1,79)	18,54 (1,92)
IGF1R em 2^{-ΔΔCT}	2,22094	2,54629	2,01298	1,76667	2,17008
RANKL em 2^{-ΔΔCT}	0,72859	1,02059	0,39402	0,32254	0,59905
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	142 (-0,21)	140 (-0,27)	163 (0,41)	178 (0,85)	146 (-0,10)
IGFBP-3 em μg/ml (escore-Z)	3,67 (0,35)	4,52 (1,68)	4,62 (1,84)	4,96 (2,38)	5,21 (2,77)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	46,4	101	84,6	36,9	34,7

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type I*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.14 Indivíduo N

Criança do sexo feminino. Apresentou três fraturas patológicas em um período de apenas dois meses: tíbia direita com um ano e oito meses de vida, fêmur direito com um ano e nove meses e úmero esquerdo com um ano e dez meses. Todas as fraturas ocorreram com baixa energia mecânica.

Indicado tratamento com pamidronato, o primeiro ciclo foi realizado aos dois anos e quatro meses. Desde o início do tratamento com bisfosfonato, não apresentou outros episódios de fraturas.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo I. Randomizada para o grupo B. Idade cronológica de cinco anos e seis meses no momento do primeiro tempo de coleta. Não apresentou intercorrências nos primeiros quatro tempos de coleta. Não foi efetuado o quinto tempo de coleta devido à pandemia de COVID-19.

Tabela 18 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo N em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	5,5	5,83	6,17	6,5	---
Estatura em cm (escore-Z)	107,5 (-0,95)	108,5 (-1,2)	110,5 (-1,14)	111,5 (-1,28)	---
IMC em Kg/m² (escore-Z)	18,82 (1,92)	18,05 (1,51)	18,50 (1,67)	18,62 (1,66)	---
IGF1R em 2^{-AACT}	1,33622	1,52330	1,20675	1,58141	---
RANKL em 2^{-AACT}	0,72455	0,82085	0,87304	0,99049	---
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	142 (-1,12)	134 (-1,23)	158 (-0,90)	160 (-0,87)	---
IGFBP-3 em µg/ml (escore-Z)	4,1 (0,46)	3,65 (-0,06)	4,41 (0,82)	4,41 (0,82)	---
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	<0,16	---
Osteocalcina em ng/ml	40,2	36,8	46,3	32,3	---

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxy-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

Tempo 5: Não foi realizada coleta devido à crise pandêmica de COVID-19.

4.1.15 Indivíduo O

Criança do sexo masculino. Iniciou seguimento no serviço HC-FMRP aos dois anos e oito meses. Foi encaminhado pela presença de múltiplas fraturas, com a primeira aos dez meses de vida no tornozelo direito, posteriormente, apresentou fraturas em fêmures e tíbia direita. Iniciou tratamento com pamidronato aos três anos e dois meses de vida e não apresentou mais fraturas. Não possui hastes.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo I. Randomizado para o grupo A. Idade cronológica de cinco anos e nove meses no momento do primeiro tempo de coleta. Não foi possível o segundo tempo de coleta devido a dificuldades técnicas, embora tenha recebido a medicação.

Tabela 19 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo O em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	5,75	6,08	6,42	6,75	7,08
Estatura em cm (escore-Z)	113 (-0,34)	116,5 (-0,04)	118 (-0,14)	119 (-0,32)	121 (-0,29)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	16,28 (0,72)	17,53 (1,44)	17,16 (1,17)	18,39 (1,75)	17,75 (1,36)
IGF1R em 2^{-ΔΔCT}	1,32552	---	1,43510	1,72141	1,02866
RANKL em 2^{-ΔΔCT}	1,02531	---	0,62466	0,57138	0,42876
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	120 (-0,86)	---	134 (-0,45)	154 (0,14)	161 (0,35)
IGFBP-3 em μg/ml (escore-Z)	1,64 (-2,85)	---	3,8 (0,55)	4,13 (1,07)	4,31 (1,36)
CTX em ng/ml	<0,16	---	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	50,6	---	55,9	52,2	48,2

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth fator 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth fator 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

Tempo 2: não conseguiu coleta devido a dificuldades técnicas.

4.1.16 Indivíduo P

Criança do sexo feminino recebeu primeira infusão de pamidronato aos cinco meses de vida. Na idade de pré-escolar, fraturas recorrentes em membros inferiores sem alta energia mecânica, com a última aos cinco anos e seis meses de idade.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo I. Randomizado para o grupo A. Idade cronológica de oito anos e cinco meses no momento do primeiro tempo de coleta. Não apresentou intercorrências e conseguiu completar os cinco tempos dentro dos limites de prazos estabelecidos.

Tabela 20 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo P em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	8,42	8,75	9,25	9,58	9,92
Estatura em cm (escore-Z)	117,5 (-1,98)	119 (-2,04)	119,5 (-2,36)	122 (-2,24)	123 (-2,37)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	13,03 (-1,96)	13,06 (-2,02)	13,51 (-1,75)	13,47 (-1,88)	13,45 (-1,99)
IGF1R em 2^{-AACT}	1,40156	2,26784	2,50795	3,64071	1,60026
RANKL em 2^{-AACT}	0,72446	0,39415	0,49414	0,18430	0,74500
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	148 (-1,04)	154 (-0,95)	137 (-1,19)	140 (-1,15)	134 (-1,23)
IGFBP-3 em µg/ml (escore-Z)	2,88 (-0,95)	3,27 (-0,50)	3,66 (-0,05)	3,46 (-0,28)	4,23 (0,61)
CTX em ng/ml	0,32	NHA	0,22	0,22	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	49,9	72	47	32,4	41,6

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.17 Indivíduo Q

Criança do sexo masculino. Apresentou fraturas de repetição com início aos dois anos de idade, com triagem no HC-FMRP aos seis anos e quatro meses, com histórico de dez fraturas no total. Indicado tratamento com pamidronato, recebeu primeiro ciclo da medicação aos seis anos e dez meses. Última fratura aos oito anos e quatro meses em região de fêmur direito.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo I. Randomizado para o grupo B. Idade cronológica de oito anos e sete meses no momento do primeiro tempo de coleta. Não apresentou intercorrências e conseguiu completar os cinco tempos dentro dos limites de prazos estabelecidos.

Tabela 21 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo Q em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	8,58	9	9,33	9,67	10
Estatura em cm (escore-Z)	124 (-1,13)	127 (-0,97)	129,5 (-0,83)	133 (-0,52)	134 (-0,64)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	14,04 (-1,41)	15,96 (-0,07)	16,61 (0,24)	17,32 (0,55)	17,29 (0,43)
IGF1R em 2^{-ΔΔCT}	1,07081	0,70277	0,94702	0,90447	1,34369
RANKL em 2^{-ΔΔCT}	0,85899	0,19528	0,62300	0,76479	0,67278
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	149 (-0,01)	164 (0,44)	211 (1,82)	186 (1,09)	156 (0,20)
IGFBP-3 em μg/ml (escore-Z)	3,87 (0,66)	3,69 (0,38)	4,77 (2,08)	4,74 (2,03)	4,24 (1,24)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	0,18	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	81,7	131	85,6	66,9	88,4

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.18 Indivíduo R

Criança do sexo masculino. Iniciou o seguimento no HC-FMRP aos dois anos e três meses. Apresentou sete fraturas prévias, cinco em região de pernas e duas em fêmures. A primeira com um ano e três meses de idade em região de tíbia e a última, em fêmur esquerdo, aos cinco anos e seis meses. Criança não apresenta haste. Iniciado pamidronato na idade de cinco anos e três meses, indicado pela presença de fraturas de repetição de baixo impacto.

Estadiamento puberal 1, com diagnóstico de OI tipo I. Randomizado para o grupo B. Idade cronológica de nove anos e dez meses no momento do primeiro tempo de coleta. Não apresentou intercorrências e conseguiu completar os cinco tempos dentro dos limites de prazos estabelecidos.

Tabela 22: Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo R em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	9,83	10,17	10,50	10,92	11,17
Estatura em cm (escore-Z)	127,5 (-1,51)	130 (-1,39)	130,5 (-1,55)	132,5 (-1,53)	134 (-1,54)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	27,28 (3,32)	26,59 (3,02)	27,01 (2,98)	28,28 (3,07)	29,12 (3,11)
IGF1R em 2^{-AACT}	2,29966	1,75032	1,80534	2,90975	1,3155
RANKL em 2^{-AACT}	0,57453	0,74702	1,05978	0,63338	0,56185
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	141 (-0,24)	166 (0,50)	158 (0,26)	173 (0,70)	165 (0,47)
IGFBP-3 em µg/ml (escore-Z)	3,44 (-0,02)	4,12 (1,06)	3,83 (0,60)	4,56 (1,75)	4,49 (1,64)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	0,23	0,16
Osteocalcina em ng/ml	34,7	71,6	62,1	40,4	38,1

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth fator 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth fator 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type I*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.19 Indivíduo S

Púbere do sexo masculino, com primeira fratura aos três meses de idade, em úmero, não associada a trauma, estava no colo do pai. Múltiplas fraturas: pé direito (dois anos de idade), antebraço esquerdo (dois anos e seis meses), tíbia esquerda (três anos e cinco meses), tíbia direita (quatro anos e dois meses), pé direito (quatro anos e dez meses). Indicado pamidronato com primeiro ciclo aos cinco anos e dois meses. Última fratura aos dez anos de idade, em um total de nove fraturas prévias.

Estadiamento puberal 2, com diagnóstico de OI tipo I. Randomizado para o grupo B. Idade cronológica de dez anos e cinco meses no momento do primeiro tempo de coleta. Não apresentou intercorrências e conseguiu completar os cinco tempos dentro dos limites de prazos estabelecidos.

Tabela 23 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo S em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	10,42	10,75	11,08	11,42	11,75
Estatura em cm (escore-Z)	129 (-1,68)	130,5 (-1,7)	132,5 (-1,69)	133,5 (-1,76)	135 (-1,82)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	17,45 (0,43)	18,2 (0,68)	18,08 (0,52)	18,15 (0,46)	18,87 (0,66)
IGF1R em 2^{-AACT}	1,20649	1,19996	1,17636	0,91437	1,83762
RANKL em 2^{-AACT}	0,63875	0,91858	0,93584	1,31116	1,70330
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	131 (-2,1)	176 (-1,37)	266 (0,11)	199 (-0,99)	242 (-0,29)
IGFBP-3 em µg/ml (escore-Z)	3,70 (-0,6)	4,39 (0,43)	5,59 (2,23)	5,38 (1,92)	5,47 (2,05)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	75,1	64,5	40,6	53,5	51,8

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth fator 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth fator 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.1.20 Indivíduo T

Púbere do sexo feminino, triagem no serviço aos dez meses de vida, com história de fraturas recorrentes no período de lactente, em fêmur e úmero esquerdos aos dois meses de vida, tibia esquerda aos oito meses de vida, tibia direita aos dez meses de idade. Indicado pamidronato, com primeiro ciclo da medicação com idade de um ano e dois meses.

Chegou a ter protocolo suspenso aos quatro anos e três meses, devido à ausência de fraturas. Voltou a apresentar fraturas, uma em região de coluna vertebral aos oito anos de idade e, posteriormente, fraturas de rádio direito e cotovelo direito. O protocolo foi, então, retomado. Última fratura, em tibia e fíbula esquerdas aos 11 anos e três meses. Apresentou um total de oito fraturas.

Estadiamento puberal 3, com diagnóstico de OI tipo I. Randomizado para o grupo A. Idade cronológica de 11 anos e sete meses no momento do primeiro tempo de coleta. Perdeu seguimento no serviço e não realizou as outras coletas programadas. Segundo tempo de coleta foi reagendado quatro vezes, no entanto, não compareceu.

Tabela 24 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo T em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	11,58	---	---	---	---
Estatura em cm (escore-Z)	142,5 (-0,93)	---	---	---	---
IMC em Kg/m² (escore-Z)	17,85 (0,07)	---	---	---	---
IGF1R em 2^{-AACT}	2,08976	---	---	---	---
RANKL em 2^{-AACT}	0,85698	---	---	---	---
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	320 (-0,21)	---	---	---	---
IGFBP-3 em µg/ml (escore-Z)	4,65 (-1,44)	---	---	---	---
CTX em ng/ml	<0,16	---	---	---	---
Osteocalcina em ng/ml	149	---	---	---	---

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; IGF1R: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; CTX: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1*.

Obs: Perdeu seguimento após coleta do tempo 1.

4.1.21 Indivíduo U

Púbere do sexo masculino. Primeira fratura ocorrida aos seis meses de idade, clavícula direita ao ser levantado. Fraturas recorrentes enquanto lactente, em clavícula esquerda, rádio e ulna. Indicado pamidronato com primeiro ciclo da medicação aos dois anos e dois meses de idade.

Chegou a ter protocolo de pamidronato suspenso por dois anos e meio, mas precisou retomar o protocolo na idade de dez anos e sete meses, devido a novas fraturas. Continuou a apresentar fraturas no decorrer do tempo, com a última em fêmur direito aos 13 anos e seis meses.

Estadiamento puberal 4, com diagnóstico de OI tipo I. Randomizado para o grupo A. Idade cronológica de 14 anos e quatro meses no momento do primeiro tempo de coleta. Não apresentou intercorrências e conseguiu completar os cinco tempos dentro dos limites de prazos estabelecidos.

Tabela 25 - Descrição dos resultados das variáveis clínicas e laboratoriais do indivíduo U em cada tempo do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5
Idade em anos	14,33	14,67	15	15,33	15,67
Estatura em cm (escore-Z)	162,5 (-0,39)	164 (-0,45)	164,5 (-0,59)	165,5 (-0,67)	166 (-0,76)
IMC em Kg/m² (escore-Z)	16,58 (-1,39)	16,84 (-1,36)	16,83 (-1,48)	16,57 (-1,76)	16,58 (-1,86)
IGF1R em 2^{-ΔΔCT}	2,55867	1,94446	2,46788	2,23872	2,75139
RANKL em 2^{-ΔΔCT}	0,54749	0,46680	0,52769	0,47276	0,87519
IGF-1 em ng/ml (escore-Z)	273 (-0,62)	303 (-0,04)	287 (-0,35)	284 (-0,41)	248 (-1,10)
IGFBP-3 em μg/ml (escore-Z)	5,33 (-1,22)	5,99 (-0,43)	5,58 (-0,92)	6,00 (-0,42)	6,00 (-0,42)
CTX em ng/ml	<0,16	NHA	<0,16	<0,16	<0,16
Osteocalcina em ng/ml	55,3	55,7	48,2	37,9	30

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; *IGF1R*: *Insulin-like growth fator 1 receptor*; *RANKL*: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; *IGF-1*: *Insulin-like growth fator 1*; *IGFBP-3*: *Growth hormone binding protein-3*; *CTX*: *Carboxi-terminal telopeptide of collagen type 1*; NHA: Não houve análise para essa variável nesse tempo.

4.2. Estudo transversal no primeiro tempo de coleta

4.2.1 Dados clínicos-antropométricos dos indivíduos

O estudo transversal representa a análise do primeiro tempo de coleta e foram elegíveis 21 indivíduos. Para ser possível a descrição das variáveis dos 21 participantes do estudo, optou-se por analisar o terceiro tempo do indivíduo A, devido a não realização de expressão gênica de RNAm de *IGF1R* e *RANKL* no tempo 1, uma vez que não houve amplificação da amostra para PCR em tempo real, e não ter conseguido coleta do tempo 2 por dificuldades técnicas. Em todos os demais foi usada a análise do primeiro tempo.

A idade média dos participantes no primeiro tempo de coleta foi de 8,92 anos. A criança mais nova (indivíduo E) tinha 3,25 anos e a mais velha (indivíduo K) 14,75 anos. A mediana de idade foi de 8,42 anos (Tabela 03).

A maioria dos participantes do estudo (61,90%) apresentavam-se impúberes (M1 ou G1), o que representa 13 dos 21 indivíduos. Entre os indivíduos púberes, havia dois em estadio puberal (EP) 2, quatro em EP 3 e dois em EP 4 (Tabela 03 e Tabela 26).

O escore-Z médio de estatura foi de -2,72 com variação entre -6,79 e -0,34, com mediana de -1,99. Destes, 10 crianças (47,62%) apresentavam baixa estatura (abaixo de -2 DP ou escore-Z -2). Embora os outros 11 apresentassem estatura dentro dos limites da normalidade, encontravam-se abaixo do P50 da curva populacional, entre o escore-Z 0 e -2 (APÊNDICE C e Figura 1).

Apresentavam baixa estatura todos os indivíduos com diagnóstico de OI tipo III, o único indivíduo com Síndrome de Bruck e cinco das sete crianças com OI tipo IV (71,43% desse grupo) (APÊNDICE C e Figura 1).

O escore-Z médio do IMC foi de 0,38, com variação entre -1,96 e 3,32. A mediana do escore-Z para o IMC foi 0,43. Uma criança (R) apresentava diagnóstico de obesidade no momento da primeira coleta. Embora nenhum participante apresentasse IMC abaixo do escore-Z -2, a criança P apresentava escore-Z próximo a esse valor de corte.

Na Figura 1, pode ser vista a distribuição das variáveis estatura e IMC, dos participantes do estudo, distribuídos conforme diagnóstico de OI.

Com intuito descritivo, os indivíduos também foram agrupados conforme o estadiamento puberal, cujos dados podem ser vistos nas tabelas 26 e 27. Na Tabela 26 há a descrição de acordo com as variáveis antropométricas (estatura e IMC). A estatura média, apresentava-se abaixo do escore-Z -2 nos grupos de estadiamento puberal 1, 2 e 3.

Figura 1 - Estatura e IMC (em escore-Z) de cada indivíduo divididos pelo diagnóstico de OI. Linha contínua representa mediana.

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 26 - Descrição dos indivíduos na avaliação transversal do estudo de acordo com o estadiamento puberal - média das seguintes características: idade (anos), Estatura (escore-Z) e IMC (escore-Z), Ribeirão Preto, 2021

EP	Nº indivíduos			Idade, média (anos)	Estatura, média (escore-Z)	IMC (escore-Z)
	Total	M	F			
1	13	5	8	6,56	-2,73	0,56
2	2	2	0	11,08	-2,82	0,13
3	4	2	2	12,43	-3,11	0,17
4	2	2	0	14,54	-1,63	-0,04
5	0	0	0	---	---	---
---	21	11	10	---	---	---

Nota: EP: Estadiamento Puberal de Tanner; IMC: Índice de massa corpórea; M: masculino; F: feminino.

4.2.2 Expressão de RNAm de *IGF1R*

A expressão de RNAm do gene do *IGF1R* (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) variou de 0,033 a 2,56, com média de 1,53 e mediana de 1,46. Em 2 crianças a expressão ficou abaixo do valor do controle, que é 1. Das 18 amostras restantes, 13 apresentaram expressão de *IGF1R* com valores entre 1 e 2 vezes o valor do controle (APÊNDICE C).

A tabela 27 descreve a análise dos parâmetros laboratoriais com as crianças e adolescentes agrupados de acordo com o estadiamento puberal (EP). Ao descrever os dados, encontrou-se que a maior média de expressão gênica de *IGF1R* (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) ocorreu no grupo de EP 4 (1,79) e a menor no grupo de EP 2 (1,37).

Tabela 27 - Descrição dos indivíduos na avaliação transversal do estudo de acordo com o estadiamento puberal - média das seguintes características: Expressão de *IGF1R* ($2^{-\Delta\Delta CT}$), expressão de *RANKL* ($2^{-\Delta\Delta CT}$), IGF-1 (ng/ml / escore-Z) e IGFBP-3 (µg/ml / escore-Z), Ribeirão Preto, 2021

Estadiamento Puberal	<i>IGF1R</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	<i>RANKL</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	IGF-1, média (ng/ml / z-e)	IGFBP-3, média (µg/ml / z-e)	Osteocalcina (ng/ml)
1	1,57	1,01	132,38 / -1,01	3,11 / -0,63	45,43
2	1,37	0,60	150,50 / -1,78	3,85 / -0,38	73,9
3	1,48	0,71	295,75 / -0,64	4,98 / -0,85	75,47
4	1,79	0,58	326,50 / 0,41	5,26 / -1,30	51,05
5	---	---	---	---	---

Nota: *IGF1R*: Insulin-like growth factor 1 receptor; *RANKL*: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; IGF-1: Insulin-like growth factor 1; IGFBP-3: Growth hormone binding protein-3; z-e: escore-Z.

A Figura 2 mostra a distribuição da expressão de *IGF1R* de cada indivíduo conforme o seu diagnóstico de OI.

Figura 2 - Expressão de RNAm de *IGF1R* (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) de cada indivíduo agrupados pelo diagnóstico de OI. Linha contínua representa mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

4.2.3 Expressão de RNAm de *RANKL*

A expressão de RNAm de *RANKL* (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) variou de 0,55 a 4,35 com média de 0,98 e mediana de 0,75. Das 20 amostras, 17 apresentaram valores inferiores a 1 (valor controle). Na descrição dos indivíduos conforme o EP, a maior média foi observada no grupo de crianças com EP 1 (1,01) e a menor no grupo com EP 4 (0,58) (Tabela 27).

A Figura 3 mostra a distribuição da expressão de *RANKL* de cada indivíduo conforme o seu diagnóstico de OI.

Figura 3 - Expressão de RNAm de *RANKL* (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) de cada indivíduo agrupados pelo diagnóstico de OI. Linha contínua representa mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

4.2.4 IGF-1 e IGFBP-3

Na análise de IGF-1, 2 crianças (indivíduos E e S) apresentaram valores inferiores ao escore-Z -2 (14,29%). Essas crianças apresentavam diagnóstico de OI tipo IV (indivíduo E) e OI tipo I (indivíduo S). E entre as 19 amostras restantes, 18 estavam entre o escore-Z -2 e 0. Uma criança portadora de OI tipo IV (indivíduo K) apresentou escore-Z acima de 0 (1,44). Os valores variaram de -2,42 e 1,44, com média de -0,86 e mediana de -0,86 (APÊNDICE C).

Em relação aos resultados de IGFBP-3, os valores variaram de -2,85 a 0,66, com média de -0,67 e mediana de -0,70. Duas crianças apresentaram valores de escore-Z abaixo de -2, indivíduos D e O, respectivamente com os diagnósticos de OI tipo III e I (APÊNDICE C).

Quando se correlaciona o estadiamento puberal e os valores de IGF-1 (em ng/ml) e IGFBP-3 (μg/ml), observa-se um aumento gradativo dos valores absolutos, conforme evolução puberal. A menor média de IGF-1 (em escore-Z) se dá no EP 2, com aumento gradativo nos estadiamentos seguintes, com um valor maior no EP 4. O oposto ocorre com escore-Z de IGFBP-3, que tem o seu maior valor no EP2, com redução gradativa nos estadiamentos seguintes, com menor valor no EP 4 (Tabela 27).

A Figura 4 mostra a distribuição de IGF-1 e IGFBP-3 de cada indivíduo conforme o diagnóstico de OI.

Figura 4 - IGF-1 e IGFBP-3 (em escore-Z ajustado para sexo e estadiamento puberal) de cada indivíduo agrupados pelo diagnóstico de OI. Linha contínua representa mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

4.2.5 Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

Na análise do marcador ósseo osteocalcina, os níveis dosados variaram entre 28,5 e 149 ng/ml, com valor médio de 54,5 e mediana de 49,9 ng/ml. Quando se descreveu a osteocalcina em relação ao estadiamento puberal, encontrou-se os maiores valores no grupo de estadiamento puberal intermediário (EP3 e EP4) (Tabela 27). Também se realizou análise de CTX, entretanto, 19 dos 21 indivíduos apresentavam valores em níveis indetectáveis pelo método laboratorial.

A Figura 5 mostra a distribuição da expressão de osteocalcina de cada indivíduo conforme o seu diagnóstico de OI.

Figura 5: Osteocalcina (em ng/ml) de cada indivíduo agrupados pelo diagnóstico de OI. Linha contínua representa mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

Na tabela abaixo, há a descrição dos demais marcadores bioquímicos (eletrólitos, função renal, enzimas hepáticas e marcadores ósseos) do metabolismo ósseo e escore-Z da densitometria óssea (DXA) dos 21 indivíduos participantes do estudo. Para essas variáveis, o tempo de coleta aconteceu em momento próximo ao tempo 1 de coleta.

Em relação à DXA, os participantes apresentavam mediana de -0,8, escore-Z médio de -0,74 e variação entre -3 e 1,9. Todas as crianças com OI tipo III (quatro) e duas portadoras de OI tipo IV apresentavam baixa massa óssea (escore-Z abaixo de -2). Não foi possível avaliar

o escore-Z da coluna lombar de duas crianças. O indivíduo E realizou o exame com idade inferior a cinco anos, desta forma não foi possível avaliação por falta de valores de referência para esta idade. E o indivíduo N, devido às limitações técnicas, não foi possível concluir o exame (Tabela 28).

Tabela 28 - Descrição dos resultados dos marcadores bioquímicos e escore-Z da DXA na avaliação transversal dos 21 participantes do estudo, Ribeirão Preto, 2021

Indivíduo	Mg (mg/d)	Ca T* (mg/d)	Pi (mg/d)	FA (U/l)	Alb (g/dl)	Cr (mg/d)	Ur (mg/d)	TGO (U/l)	TGP (U/l)	DXACL (z-e)
A	2,06	9,66	4,58	441	4,26	0,21	23,08	36,34	13,39	-3
B	2,1	9,35	4,5	537,2	4,7	0,43	27,4	37,1	30,6	-2,7
C	2,12	10,43	5,06	360,54	4,16	0,28	23	54,45	12,68	-2,6
D	1,98	9,66	5,19	503,73	4,15	0,2	20,19	22,61	13,93	-2
E	2,17	10,23	6,12	435,33	4,59	0,3	29,32	60,29	32,08	**
F	2,26	9,71	5,02	424,16	4,48	0,47	27,98	27,67	15,59	0,9
G	2,06	9,46	5,89	668,97	4,28	0,42	23,59	28,27	13,4	-1
H	1,63	9,61	4,76	437,44	4,66	0,51	34,8	28,44	11,09	-2,2
I	2,38	10,37	4,9	669,34	4,51	0,32	29,84	52,77	25,57	-2,5
J	1,88	9,87	4,18	713,32	4,62	0,61	23,14	19	13,71	-0,8
K	2,28	10,07	3,83	253,18	4,5	0,66	26,03	19,32	11,04	0,4
L	2,33	10,18	4,9	485,16	4,16	0,29	27,16	28,11	27,87	-0,1
M	2,14	9,44	5,32	517,11	4,64	0,36	45,42	25,57	12,33	-0,1
N	2,2	10,56	4,55	601,7	4,3	0,39	24,11	32,58	18,45	***
O	2,4	9,15	4,45	858	4,3	0,36	20,18	36,05	67,29	1,9
P	2	9,44	4,53	529,78	4,68	0,31	23,92	26,03	11,1	0,5
Q	2,32	8,96	5,2	544,75	4,55	0,33	25,92	32,11	18,83	-1,1
R	2,41	9,36	4,22	590,6	4,46	0,4	29,22	28,99	18,28	1
S	1,81	9,52	4,4	582	4,6	0,46	24	36,5	19,9	0,5
T	2,49	9,95	4,28	597,12	4,46	0,26	22,49	16,78	19,55	-1,6
U	2,6	9,75	4,31	971,13	4,57	0,58	18,75	24,73	22,43	0,5

Nota: Mg: magnésio; Ca T: cálcio total; Pi: fósforo inorgânico; FA: fosfatase alcalina; alb: albumina; Cr: creatinina; Ur: ureia; TGO: transaminase glutâmico oxalacética; TGP: transaminase glutâmico pirúvica; DXA-CL: Densitometria óssea- sítio coluna lombar;

* Cálcio total corrigido pelo valor da albumina.

**Quando realizou o exame, apresentava idade inferior a 5 anos, e apenas há valores de referência (escore-Z) para crianças acima de 5 anos.

***Devido às limitações técnicas, não foi possível concluir o exame.

4.2.6 Avaliação das variáveis conforme o tipo de OI

Distribuiu-se os indivíduos conforme o diagnóstico de OI, aplicado o teste de Kruskal Wallis para as variáveis não paramétricas, encontrou-se diferença estatística apenas na comparação estatural ($p= 0,0003$). Realizou em seguida para essa variável, o teste de múltiplas comparações de Dun. O grupo de crianças com OI tipo I apresentou média de estatura maior que a OI tipo III ($p= 0,0005$) e maior que a OI tipo IV ($p= 0,0014$).

Nas demais comparações, embora não tenha sido evidenciada evidência estatística na análise, observou-se maior média de expressão de *IGF1R* nas crianças com diagnóstico de OI tipo I e a menor média na OI tipo III ($p= 0,873$) (Tabela 29).

Na expressão de *RANKL* encontrou-se resultados inversos ao descrito anteriormente para o *IGF1R*, com o maior valor da média observado no grupo com OI tipo III (1,14) e as menores médias no grupo de indivíduos com OI tipo 1 (0,73), também sem significado estatístico ($p= 0,183$) (Tabela 29).

Embora sem significado estatístico, o grupo com crianças com a forma mais grave da doença, OI tipo III, apresentaram as menores médias das variáveis IGF-1 ($p= 0,143$), IGFBP-3 ($p= 0,669$) e osteocalcina ($p= 0,161$) (Tabela 29).

Tabela 29 - Comparação das variáveis contínuas, na avaliação transversal do estudo, de acordo com a classificação clínica da OI – Médias e medianas representadas em anos para idade, em escore padrão para Estatura, IMC, IGF-1 e IGFBP-3 (escore-Z), em $2^{-\Delta\Delta CT}$ para as expressões gênicas de *IGF1R* e *RANKL* e ng/ml para osteocalcina, Ribeirão Preto, 2021

OI tipo	I	III	IV e Sd Bruck	Valor-p*
Nº indivíduos	9	4	8	---
Idade, média/mediana (anos)	8,82/8,58	6,67/6,54	10,15/11,87	0,241
Estatura, média/mediana (escore-Z)	-1,06/-0,95	-5,47/-5,22	-3,21/-2,97	0,0003**
IMC, média/mediana (escore-Z)	0,24/0,43	0,53/0,58	0,47/0,47	0,867
<i>IGF1R</i> , média/mediana ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	1,71/1,40	1,17/1,50	1,59/1,50	0,873
<i>RANKL</i> , média/mediana ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	0,73/0,72	1,14/0,96	0,91/0,70	0,183
IGF-1, média/mediana (escore-Z)	-0,71/-0,62	-1,41/-1,50	-0,75/-0,70	0,143
IGFBP-3, média/mediana (escore-Z)	-0,62/-0,60	-0,97/-1,13	-0,58/-0,65	0,669
Osteocalcina, média/mediana (ng/ml)	64,76/50,6	39,98/36,00	50,16/49,55	0,161

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; *IGF1R*: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; *RANKL*: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*. Foi analisado o tempo 3 do indivíduo A, devido a intercorrências ocorridas nas coletas dos tempos 1 e 2.

*Aplicado teste de Kruskal Wallis

**Aplicado teste de comparações múltiplas de Dun: OI I > OI III ($p=0,0005$); OI I > OI IV ($p= 0,0014$)

4.2.7 Avaliação conforme com a gravidade da doença óssea

Os indivíduos foram divididos em dois grupos, conforme a gravidade da doença. Um grupo com os portadores de formas leves (OI tipo I) e o outro com formas moderadas e graves (OI tipo III, IV e Síndrome de Bruck). Foi realizada análise comparativa dos parâmetros analisados e aplicado o teste de Mann-Whitney para avaliar diferenças de dois grupos independentes de variáveis contínuas (Tabela 30).

Apenas nas comparações de estatura ($p < 0,01$), DXA ($p = 0,02$) e fosfatase alcalina ($p = 0,03$) indicam haver diferenças significativas entre os dois grupos, com maiores médias observadas no grupo com formas leves da doença (Tabela 30).

Embora nas demais comparações não tenham sido evidenciadas diferenças estatísticas, valores médios mais elevados para expressão gênica de *IGF1R*, dosagens séricas de IGF-1, IGFBP-3 e osteocalcina foram encontrados no grupo com formas leves, e valores mais elevados de expressão de *RANKL* no grupo formado por formas moderadas e graves (Tabela 30). No Apêndice D, há descrição detalhada da análise estatística.

Nas figuras 6 a 9, as variáveis estão ilustradas em diagrama de caixas (boxplots) que compara as formas leves com formas moderadas e graves (Figuras 6 a 9).

Tabela 30 - Comparação das variáveis contínuas, na avaliação transversal do estudo, dos grupos com crianças que apresentam formas leves e formas moderadas e graves, representadas em médias e desvio padrão (DP), Ribeirão Preto, 2021

Variável	Formas leves	Formas moderadas e graves	p-valor*
Número de indivíduos	9	12	---
Idade, média/mediana (em anos)	8,82/8,58	8,90/7,46	0,92
Estatura, média/mediana (em escore-Z)	-1,06/-0,95	-3,94/-4,10	<0,01
IMC, média/mediana (em escore-Z)	0,24/0,43	0,51/0,48	0,62
<i>IGF1R</i> **, média/mediana (em $2^{-\Delta\Delta CT}$)	1,71/1,40	1,43/1,46	0,65
<i>RANKL</i> **, média/mediana (em $2^{-\Delta\Delta CT}$)	0,73/0,72	0,98/0,78	0,40
IGF-1, média/mediana (em escore-Z)	-0,71/-0,62	-1,01/-1,07	0,18
IGFBP-3, média/mediana (em escore-Z)	-0,62/-0,60	-0,78/-0,72	0,67
Osteocalcina, média/mediana (em ng/ml)	64,76/50,60	46,62/46,30	0,19
Ca total, média/mediana (em mg/dl) ***	9,57/9,44	9,88/9,79	0,09
Mg, média/mediana (em mg/dl)	2,26/2,32	2,10/2,11	0,11
Pi, média/mediana (em mg/dl)	4,58/4,45	4,91/4,90	0,21
Alb, média/mediana (em g/dl)	4,51/4,55	4,42/4,49	0,41
FA, média/mediana (em U/L)	643,58/590,60	494,11/463,08	0,03
Ur, média/mediana (em mg/dl)	26,00/24,00	26,29/26,60	0,41
Cr, média/mediana (em mg/dl)	0,38/0,36	0,39/0,37	0,97
TGP, média/mediana (em U/L)	23,13/18,83	18,41/13,82	0,50
TGO, média/mediana (em U/L)	28,82/28,99	34,53/28,36	0,55
DXA, média/mediana (em escore-Z)	0,20/0,50	-1,42/-2,00	0,02

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; *IGF1R*: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; *RANKL*: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; Ca: cálcio; Mg: magnésio; Pi: fósforo inorgânico; alb: albumina; FA: fosfatase alcalina; Ur: ureia; Cr: creatinina; TGO: transaminase glutâmico oxalacética; TGP: transaminase glutâmico pirúvica; DXA: densitometria óssea.

Formas leves: indivíduos com OI tipo 1; Formas moderadas e graves: indivíduos com OI tipo 3, 4 e Sd de Bruck

*Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

**Expressão gênica de RNAm.

*** Valor corrigido pela albumina sérica.

Figura 6 - Boxplot da estatura e IMC (valores representados em escore-Z) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana

Fonte: elaborada pelo autor

Figura 7 - Boxplot da expressão gênica de RNAm de *IGF1R* e *RANKL* (valores representados em $2^{-\Delta\Delta CT}$) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 8 - Boxplot do IGF-1 e IGFBP-3 (valores representados em escore-Z ajustados pelo estadiamento puberal) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 9 - Boxplot da osteocalcina (valores representados em ng/ml) e DXA (valores representados em escore-Z) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

4.3 Análise dos parâmetros sobre influência de um ciclo de Ácido Zoledrônico vs Pamidronato

Os participantes do estudo, conforme apresentado anteriormente, foram randomizados em dois grupos. Com a randomização dos grupos, foi sorteado que o grupo A continuaria a receber o pamidronato após a terceira coleta e o grupo B receberia ácido zoledrônico a partir da terceira coleta.

Nessa parte do estudo foram considerados elegíveis aqueles que tiveram duas coletas séricas, nos quais as variáveis foram avaliadas sobre a influência de um ciclo da medicação, com intervalo aproximado de quatro meses ou um pouco mais de 17 semanas. As análises foram feitas nas amostras coletadas nos tempos 3 e 4. Após coleta basal do terceiro tempo, foi realizada a troca do pamidronato pelo ácido zoledrônico no grupo B e manutenção do pamidronato no grupo A.

Dos 21 participantes dessa parte do estudo, um indivíduo (T) foi excluído devido à perda de seguimento clínico e outro (K) por ter cessado as coletas no tempo 3. Neste último, a interrupção do protocolo ocorreu porque a criança atingiu estágio puberal 5. Essas crianças faziam parte do grupo A, ou seja, continuariam a receber pamidronato após a terceira dose. Dessa forma, foram elegíveis oito indivíduos para o grupo A, e 11 para o grupo B.

A Tabela 31 descreve os participantes da parte 2 do estudo, separados pelos grupos de randomização, conforme suas características clínicas quanto ao sexo, idade média no momento da terceira coleta, classificação de OI de acordo com os critérios de Sillence e estadiamento puberal. Há um maior número de indivíduos do sexo masculino no grupo A e feminino no grupo B. Uma maior média de idade no grupo A. Predomínio de indivíduos com classificação de OI tipo 1 e estadiamento puberal 1 nos dois grupos.

A Tabela 32 descreve os valores médios das variáveis clínicas e laboratoriais analisadas nos tempos 3 e 4 do estudo.

Descrito na Tabela 33 a análise da diferença entre os grupos A e B, da variação (delta) da média das variáveis clínicas e laboratoriais entre os tempos 3 e 4 (D43). A probabilidade da verdadeira diferença entre variação das médias dos grupos, na população, estar entre os limites inferior e superior do intervalo de credibilidade é de 95%, e como em todas as variáveis analisadas, a margem de valores do LI ao LS compreendem o valor zero, dessa forma não há diferenças entre os grupos analisados (Tabela 33). No Apêndice E, há descrição detalhada da análise estatística.

As linhas de variação entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo estão representadas nas Figuras 10 a 14. E as diferenças de variações nas médias entre os tempos 3 e 4 estão representadas nas Figuras 15 a 19.

Tabela 31 - Descrição dos grupos que foram elegíveis a participar da avaliação longitudinal de um ciclo das medicações, quanto a sexo, idade, classificação da OI e estadiamento puberal, Ribeirão Preto, 2021

Características	Grupo A	Grupo B
Número de indivíduos	8	11
Nº Sexo Masculino	5	5
Nº Sexo Feminino	3	6
Idade média em anos*	9,92	8,78
Classificação OI em nº		
I	4	4
III	1	3
IV	2	4
SB	1	0
Estadiamento Puberal em nº		
1	5	8
2	1	1
3	1	2
4	1	0
5	0	0

Nota: OI: Osteogênese imperfeita; SB: Síndrome de Bruck.

Grupo A: indivíduos randomizados para continuar a receber pamidronato

Grupo B: indivíduos randomizados para troca do pamidronato para ácido zoledrônico

*No tempo da primeira análise dessa parte do estudo, que corresponde ao tempo 3 de coleta.

Tabela 32 - Descrição dos grupos A e B – avaliação longitudinal de um ciclo das medicações nas coletas dos tempos 3 e 4: representação das variáveis, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Grupo A		Grupo B	
	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 3	Tempo 4
Idade (anos)	9,92	10,28	8,79	9,11
E, média (cm)	124,19	126,25	111,59	113,23
E, média (escore-Z)	-2,21	-2,18	-3,34	-3,34
IMC, média (Kg/m ²)	17,85	17,92	17,96	18,28
IMC, média (escore-Z)	0,38	0,35	0,61	0,62
Expressão de <i>IGF1R</i> (em 2 ^{-ΔΔCT})	2,00	2,06	1,45	1,61
Expressão de <i>RANKL</i> (em 2 ^{-ΔΔCT})	0,52	0,43	0,75	0,82
IGF-1, média (ng/ml)	209,38	229,25	197,33	191,62
IGF-1 média (escore-Z)	-0,36	0,02	-0,36	-0,46
IGFBP-3, média (μg/ml)	4,45	4,82	4,37	4,44
IGFBP-3, média (escore-Z)	0,31	0,79	0,47	0,54
Osteocalcina, média (ng/ml)	53,06	53,95	50,59	46,14

Nota: E: estatura; IMC: Índice de massa corpórea; *IGF1R*: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; *RANKL*: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*;

Grupo A: indivíduos randomizados para continuar a receber pamidronato

Grupo B: indivíduos randomizados para troca do pamidronato para ácido zoledrônico

Tabela 33- Comparação das variações dos resultados dos parâmetros analisados entre as coletas 3 e 4 dos grupos A e B. Ribeirão Preto, 2021

Variável* (tempo 4 – tempo 3)	Grupo A	Grupo B	Diferença entre médias (A-B) **	LI ICr 95%	LS ICr 95%
Idade (anos)	0,36	0,33	0,03	---	---
Intervalo em sem.	18,37	17,27	-1,1	---	---
Estatura (escore-Z)	0,03	0,00	0,03	-0,13	0,19
IMC (escore-Z)	-0,03	0,01	-0,04	-0,30	0,22
<i>IGF1R</i> (em 2 ^{-ΔΔCT})	0,06	0,16	-0,10	-0,81	0,58
<i>RANKL</i> (em 2 ^{-ΔΔCT})	-0,09	0,07	-0,16	-0,40	0,08
IGF-1 (escore-Z)	0,38	-0,10	0,48	-0,05	1,01
IGFBP-3 (escore-Z)	0,48	0,07	0,41	-0,07	0,87
Osteocalcina (ng/ml)	0,89	-4,45	5,34	-18,72	28,56

Nota: sem: semanas; IMC: Índice de massa corpórea; *IGF1R*: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; *RANKL*: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; LI: Limite inferior; LS: Limite superior; ICr: Intervalo de Credibilidade.

Grupo A: indivíduos randomizados para continuar a receber pamidronato

Grupo B: indivíduos randomizados para troca do pamidronato para ácido zoledrônico

*Variação entre os tempos 3 e 4

**Diferença entre as variações das médias dos tempos (A-B)

As figuras abaixo mostram a evolução de cada variável entre os tempos 3 e 4 (Figuras 10-14).

Figura 10 - Variação da expressão de RNAm de *IGF1R* (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 11 - Variação da expressão de RNAm de *RANKL* (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 12 - Variação de IGF-1 (em ng/ml) entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 13- Variação de IGFBP-3 (em µg/ml) entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 14 - Variação de Osteocalcina (em ng/ml) entre os tempos 3 e 4 de cada indivíduo

Fonte: elaborado pelo autor.

Não foi possível análise do CTX, nos estudos longitudinais de um e dois ciclos, uma vez que a maioria das amostras se encontrava abaixo dos níveis de detecção do método. O número de amostras com resultado abaixo do nível de detecção foram 19 das 21 amostras no primeiro tempo de coleta (90,48%), 17 das 20 do terceiro tempo (85%), 13 das 19 do quarto tempo (68,42%) e 13 das 16 do quinto tempo (81,25%).

No estudo longitudinal de um ciclo de bisfosfonatos, na comparação entre o grupo que recebeu ácido zoledrônico e o que recebeu pamidronato, não foi evidenciada diferença estatística na evolução média das variáveis analisadas.

4.4 Análise dos parâmetros sobre influência de dois ciclos de Ácido Zoledrônico vs Pamidronato

Foram avaliados os parâmetros dos indivíduos após dois ciclos das medicações, nos quais todos recebiam previamente a medicação pamidronato. No grupo A ficaram os indivíduos que continuaram a receber o pamidronato por mais dois ciclos da medicação. No grupo B ficaram alocadas as crianças que tiveram a medicação pamidronato substituída por ácido zoledrônico e, portanto, tiveram suas variáveis analisadas após dois ciclos desta medicação.

Dos 21 indivíduos elegíveis para essa parte do estudo, cinco foram excluídos, três deles devido a impossibilidade da coleta pela pandemia de COVID-19, um por perda de seguimento e um por interrupção do protocolo por completar estadiamento puberal 5 (Tabela 34).

Tabela 34 - Motivo de exclusão dos indivíduos da avaliação longitudinal de dois ciclos das medicações, Ribeirão Preto, 2021

Indivíduos excluídos	Grupo que pertenciam	Motivo da exclusão
C	B	Não realizada coleta do último tempo devido à crise pandêmica de COVID-19.
I	B	Não realizada coleta do último tempo, devido à crise pandêmica de COVID-19.
K	A	Interrompido protocolo por ter atingido estadiamento puberal G5 antes do último tempo de coleta.
N	B	Não realizada coleta do último tempo, devido à crise pandêmica de COVID-19.
T	A	Perdeu seguimento.

Nota: A: Grupo A; B: Grupo B; COVID-19: *Coronavirus Disease* 2019

A Tabela 35 descreve as características dos grupos de randomização nessa parte do estudo. No grupo A houve um predomínio de indivíduos do sexo masculino (62,5%), enquanto no grupo B, não há diferença numérica. A idade média é maior no grupo A. A maioria dos participantes do grupo A tem o diagnóstico de OI tipo I, enquanto no grupo B, a maioria com OI tipo I e tipo IV. Em ambos os grupos, a maioria encontra-se impúbere no momento das avaliações.

A Tabela 36 descreve as médias das variáveis clínicas e laboratoriais dos grupos A e B, analisadas nos tempos de 3 e 5.

A Tabela 37 descreve a diferença entre os grupos A e B, da variação (delta) da média das variáveis clínicas e laboratoriais entre os tempos 3 e 5 (D53). Apenas na variável expressão gênica de *IGF1R* há probabilidade dessa diferença entre os dois grupos ser verdadeira na população, uma vez que a diferença das variações compreenderia um valor entre -1,37 (LI) a -0,07 (LS), sendo menor no grupo A (com intervalo de credibilidade de 95%) (Tabela 37 e Figura 15). No Apêndice E, há descrição detalhada da análise estatística.

As diferenças de variações nas médias entre os tempos 3 e 5 estão representadas nas Figuras 15 a 19. As linhas de variação entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo estão representadas nas Figuras 20 a 24.

Tabela 35 - Descrição dos grupos que foram elegíveis a participar da avaliação longitudinal de dois ciclos das medicações, quanto ao sexo, idade, classificação da OI e estadiamento puberal, Ribeirão Preto, 2021

Características	Grupo A	Grupo B
Número de indivíduos	8	8
Sexo Masculino	5	4
Sexo Feminino	3	4
Idade média (em anos)*	9,87	8,65
Classificação OI (n°)		
1	4	3
3	1	2
4	2	3
SB	1	0
Estadiamento Puberal (n°)		
I	5	6
II	1	1
III	1	1
IV	1	0
V	0	0

Nota: OI: Osteogênese imperfeita; SB: Síndrome de Bruck.; Grupo A: indivíduos randomizados para continuar a receber pamidronato; Grupo B: indivíduos randomizados para troca do pamidronato para ácido zoledrônico

*No tempo da primeira análise dessa parte do estudo, que corresponde ao tempo 3 de coleta.

Tabela 36 - Descrição dos grupos A e B – avaliação longitudinal de dois ciclos das medicações - nas coletas dos tempos 3 e 5: representação das variáveis, Ribeirão Preto, 2021

Variáveis	Grupo A		Grupo B	
	Tempo 3	Tempo 5	Tempo 3	Tempo 5
Idade (anos)	9,92	10,65	8,65	9,32
E, média (cm)	124,18	128,56	112,25	115,81
E, média (escore-Z)	-2,20	-2,12	-3,20	-3,13
IMC, média (Kg/m ²)	17,85	17,79	17,44	18,19
IMC, média (escore-Z)	0,38	0,21	0,30	0,45
Expressão de <i>IGF1R</i> (em 2 ^{-ΔΔCT})	1,99	1,89	1,42	2,01
Expressão de <i>RANKL</i> (em 2 ^{-ΔΔCT})	0,52	0,72	0,81	1,12
IGF-1, média (ng/ml)	209,37	210,62	197,57	201,15
IGF-1 média (escore-Z)	-0,35	-0,34	-0,18	-0,17
IGFBP-3, média (μg/ml)	4,45	4,87	4,29	4,54
IGFBP-3, média (escore-Z)	0,32	0,92	0,56	0,85
Osteocalcina	53,06	50,41	50,77	46,31

Nota: E: estatura; IMC: Índice de massa corpórea; *IGF1R*: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; *RANKL*: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; Grupo A: indivíduos randomizados para continuar a receber pamidronato; Grupo B: indivíduos randomizados para troca do pamidronato para ácido zoledrônico

Tabela 37 - Comparação das variações dos resultados dos parâmetros analisados entre as coletas 3 e 5 dos grupos A e B, Ribeirão Preto, 2021

Variável* (tempo 5 – tempo 3)	Grupo A	Grupo B	Diferença entre médias (A-B) **	LI ICr 95%	LS ICr 95%
Idade (anos)	0,73	0,67	0,06	---	---
Intervalo em semanas	38,37	35,62	2,75	---	---
Estatura (escore-Z)	0,08	0,07	0,01	-0,31	0,32
IMC (escore-Z)	-0,17	0,15	-0,32	-0,72	0,07
IGF1R (em $2^{-\Delta\Delta CT}$)	-0,10	0,59	-0,69	-1,31	-0,07
RANKL (em $2^{-\Delta\Delta CT}$)	0,20	0,31	-0,11	-0,60	0,38
IGF-1 (escore-Z)	0,01	0,01	0,00	-1,04	1,19
IGFBP-3 (escore-Z)	0,60	0,29	0,31	-0,39	1,07
Osteocalcina	-2,65	-4,46	-1,81	-20,36	24,74

Nota: IMC: Índice de massa corpórea; *IGF1R*: *Insulin-like growth factor 1 receptor*; *RANKL*: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3: *Growth hormone binding protein-3*; LI: Limite inferior; LS: Limite superior; ICr: Intervalo de Credibilidade.

Grupo A: indivíduos randomizados para continuar a receber pamidronato

Grupo B: indivíduos randomizados para troca do pamidronato para ácido zoledrônico

*Variação entre os tempos 3 e 5

**Diferença entre as variações das médias dos tempos (A-B)

Nas figuras abaixo, representação das variações das médias das variáveis dos grupos em boxplot.

Figura 15 - Boxplot da diferença da variação das médias da expressão gênica de RNAm de *IGF1R* (valores representados em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 16 - Boxplot da diferença da variação das médias da expressão gênica de RNAm de *RANKL* (valores representados em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 17 - Boxplot da diferença da variação das médias de IGF-1 (valores representados em escore-Z) entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 18 - Boxplot da diferença da variação das médias de IGFBP-3 (valores representados em escore-Z) entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 19 - Boxplot da diferença da variação das médias de osteocalcina (valores representados em ng/ml) entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53) dos 2 grupos. Linha contínua representa a mediana

Fonte: elaborado pelo autor.

As figuras abaixo mostram a evolução de cada variável entre os tempos 3 e 5 (Figuras 20-24).

Figura 20 - Variação da expressão de RNAm de *IGF1R* (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 21 - Variação da expressão de RNAm de *RANKL* (em $2^{-\Delta\Delta CT}$) entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 22: Variação de IGF-1 (em ng/ml) entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 23 - Variação de IGFBP-3 (em µg/ml) entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 24 -Variação de Osteocalcina (em ng/ml) entre os tempos 3 e 5 de cada indivíduo

Fonte: elaborado pelo autor.

No estudo longitudinal de dois ciclos de bisfosfonatos, nas comparações entre o grupo que recebeu ácido zoledrônico com o que recebeu pamidronato, foi evidenciada diferença estatística na evolução média das variáveis analisadas, apenas na expressão de RNAm de *IGF1R*. Nas demais variáveis, não foi evidenciada diferença estatística.

No Apêndice C, há a descrição dos resultados clínicos e laboratoriais dos indivíduos participantes do estudo com tabelas de cada tempo de coleta.

Nos 5 tempos analisados dos 21 indivíduos participantes do estudo, foram 92 amostras para dosagem de IGF-1, IGFBP-3 e osteocalcina, e 91 para expressão gênica de RNAm de *IGF1R* e *RANKL*. Os resultados dessas amostras estão demonstrados no Apêndice F, em que cada indivíduo com uma cor diferente está representado por pontos correspondentes a cada tempo de coleta e uma reta de tendência.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra de forma original o impacto de duas diferentes abordagens terapêuticas, ácido zoledrônico ou pamidronato, sobre componentes do eixo GH-IGF em crianças com OI. Os resultados encontrados sugerem que o tratamento com ácido zoledrônico provoca aumento na expressão do receptor tipo 1 do IGF (*IGF1R*) quando comparado ao tratamento com pamidronato em crianças com OI, sem apresentar diferença no impacto sobre as concentrações séricas de IGF-I e IGFBP-3. Também observamos que os dois tratamentos se acompanham de valores semelhantes na expressão do *RANKL* e nas concentrações de osteocalcina, o que pode reforçar o ácido zoledrônico como opção terapêutica ao pamidronato no tratamento da OI.

5.1 Expressão gênica de RNAm de *IGF1R*

Crianças com OI apresentam uma elevada taxa de renovação óssea, com aumento dos índices de formação e reabsorção óssea (RAUCH et al., 2000), processo do qual participa o sistema IGF (FANG et al., 2019). IGFs são hormônios anabólicos com importante ação autócrina, parácrina e endócrina sobre a proliferação e a diferenciação celular, tendo o *IGF1R* como principal receptor para intermediar essas ações. Alterações nas concentrações de IGF-I ou na sua atividade são em geral associadas a distúrbios de crescimento, quer deficiente ou excessivo. A regulação da bioatividade deste eixo pode ocorrer em diversos pontos desde a síntese e secreção do IGF, sua associação com suas proteínas de ligação (IGFBPs) até sua interação com o *IGF1R* e posterior sinalização (MARTINELLI; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008).

Aumento na expressão do *IGF1R* pode tanto constituir um evento primário na regulação da atividade dos IGFs, como refletir um ajuste compensatório de alteração em outro nível do eixo GH-IGF, na tentativa de compensar a diminuição da ação do IGF-1. Foi descrito que em crianças com Puberdade Precoce Central que a instituição do tratamento com análogo do GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofina) é acompanhada de aumento da expressão do *IGF1R*, mas com normalização da velocidade de crescimento mesmo na presença de concentrações elevadas de IGF-1 e IGFBP-3. Esses achados sinalizam para um bloqueio intracelular da ação do IGF-1 e um *up-regulation* compensatório do *IGF1R* (SARTI DE PAULA, 2015).

Também foi observado em crianças e adolescentes com insensibilidade parcial ao hormônio do crescimento ou IGF-1, encontrou expressão de *IGF1R* mais elevada no grupo que apresentava maior pico de GH aos testes de estímulo farmacológico (MILANI, 2009).

O aumento na expressão do *IGF1R* foi descrito em associação a alta estatura em crianças obesas, desta forma potencializando a ação do IGF-1. Em avaliação da expressão de RNAm de *IGF1R* em 47 crianças impúberes, com 29 destas obesas. Encontrou-se uma maior expressão do gene do *IGF1R* nas crianças obesas quando comparado ao grupo controle (RICCO et al, 2018). Contudo, um estudo que debate a obesidade como doença de base, que comparou um grupo de 15 crianças obesas com um grupo controle de 15 crianças hígdas, com crianças com idade entre oito e 18 anos, não encontrou diferenças estatísticas na expressão de *IGF1R* (DARRIGO, 2017).

Assim, o fator nutricional pode ter um efeito impactante na avaliação dessas crianças com OI. Apesar de termos avaliado o IMC, este não foi analisado como variável de interferência. É importante ressaltar que uma criança do nosso estudo apresentava diagnóstico de obesidade. Essa criança foi randomizada para o grupo B.

Pouco se sabe sobre a expressão gênica de *IGF1R* em crianças e adolescentes com diagnóstico de OI, não encontramos relatos na literatura para comparação com nossos resultados. Fazia parte dos objetivos iniciais desse trabalho, comparar os achados em OI com um grupo controle de crianças e adolescentes hígdos. No entanto, nossas coletas e análises precisaram ser interrompidas devido à crise pandêmica de COVID-19.

Quando comparamos os indivíduos segundo o tipo de OI, tivemos uma expressão média menor na forma mais grave, OI tipo III, e maior na OI tipo I, sem significância estatística. Quando agrupamos conforme a gravidade da doença, também observamos uma menor expressão nas formas moderadas e graves, mas com valores não significantes. A grande maioria dos indivíduos apresentou resultados de expressão percentualmente acima do controle. Não houve significância estatística para os achados.

Não foi possível realização de uma análise estatística comparativa entre os grupos de EP, uma vez que há poucos indivíduos representados nos grupos de EP 2, 3 e 4, ou seja, a maioria dos participantes eram impúberes, o que pode levar a uma distribuição heterogênea das formas leves, moderadas e graves entre os grupos de EP. Assim, os achados servem apenas como meio descritivo da população do nosso estudo.

Ao compararmos os tratamentos, pamidronato e ácido zoledrônico, não encontramos diferenças na evolução das médias da expressão de *IGF1R* entre os grupos, quando avaliado o efeito de um ciclo da medicação. Embora tenhamos encontrado um maior aumento da expressão no grupo B, sem significância estatística.

No entanto, quando avaliamos o efeito de dois ciclos da medicação, observamos uma diferença significativa da variação das médias da expressão de *IGF1R*, com resultado maior

no grupo de indivíduos que receberam ácido zoledrônico. A variação no grupo que recebeu ácido zoledrônico foi positiva enquanto a do grupo que recebeu pamidronato foi negativa. A avaliação por um período mais prolongado que a influência de dois ciclos seria recomendada para se averiguar a manutenção desta tendência.

Também importante citar estudos que correlacionam estresse agudo a regulação do sistema IGF. Um destes avaliou o efeito da hipóxia aguda em 27 crianças previamente saudáveis com idade entre 15 dias e nove anos e meio. Estudou situações em que essas crianças estavam em estado de hipoxemia, e posteriormente com recuperação total do quadro respiratório. Encontrou maior expressão de RNAm de *IGF1R* no estado de hipóxia quando comparado ao estado de recuperação (CUSTODIO et al., 2012).

Esses achados podem ser atribuídos a regulação positiva do processo de transcrição a uma agressão aguda. Em nosso estudo, o interferente de estresse agudo que poderia influenciar a expressão de *IGF1R* é a ocorrência de fraturas, mas não há estudos relacionados a esse fator na literatura, além disso, não era objetivo do nosso estudo correlacionar eventos de fraturas e expressão de *IGF1R*.

Um estudo argentino avaliou a cinética da expressão de *IGF1R* em linfócitos T, no intervalo compreendido entre zero e 48 horas após ativação celular. Observou que a expressão sofre uma redução inicial seguida por posterior restauração da expressão do receptor, atingindo níveis mais elevados que os valores registrados inicialmente. Isso poderia ser resultado de um processo de reciclagem do receptor (SEGRETIN et al., 2003).

Em nosso estudo, as nossas análises se fizeram em um período aproximado de quatro meses após a infusão da medicação, dessa forma não houve uma análise da expressão de *IGF1R* em um tempo próximo à administração da medicação.

Entre outras causas que podem levar ao aumento da expressão de *IGF1R*, podemos citar tumores. O IGF1R consegue exibir atividades anti-apoptóticas e mitogênicas potentes, o que exerce um papel crucial na invasão, metástase e angiogênese, o que confere uma maior capacidade de sobrevivência das células cancerosas. Desta forma nos últimos anos, a regulação da expressão do *IGF1R* tem sido avaliada como possível ponto de modulação da bioatividade dos IGFs tanto na determinação do crescimento estatural quanto na gênese e crescimento tumoral (WERNER; SARFSTEIN, 2014). Doenças oncológicas também não foram objetivos do nosso estudo.

A expressão do *IGF1R* pode ser representada como uma parábola ou forma de “U” sendo maior em associação com aumento de atividade dos IGFs, como observado em crianças obesas altas (RICCO et al., 2018), em células tumorais (WERNER; SARFSTEIN, 2014),

mais baixa em indivíduos eutróficos com estatura normal e novamente elevada em situações de baixa atividade dos IGFs como nos quadros de baixa estatura por provável insensibilidade ao GH/IGF (MILANI, 2009), hipóxia (CUSTODIO et al., 2012) ou desaceleração do crescimento induzida por análogos de GnRH (SARTI DE PAULA, 2015).

5.2 Estatura, IMC e dosagem sérica de IGF-1 e IGFBP-3

Quanto à avaliação estatural, encontramos uma maior média de escore-Z na OI tipo I, e menor na OI tipo III, o que é esperado para a doença. Todos os tipos de OI apresentaram médias de IMC dentro dos valores de normalidade.

Quando avaliamos os grupos de tratamento, observamos que os indivíduos randomizados para o grupo B apresentavam uma menor média estatural (escore-Z e valores absolutos). Provavelmente, isso ocorreu devido à randomização de um maior número de indivíduos com a forma mais grave da doença no grupo que recebeu ácido zoledrônico.

Não encontramos diferenças nas variações das médias de estatura entre os grupos, tanto na avaliação da influência de um ciclo quanto na de dois ciclos da medicação. Tivemos uma pequena melhora no escore-Z de ambos os grupos de tratamento.

Em relação ao IMC, também não encontramos diferenças nas variações de um ou dois ciclos da medicação entre os grupos. Observamos uma discreta redução no escore-Z do IMC no grupo A e um discreto aumento no grupo B. No entanto, a presença do indivíduo obeso no grupo B pode ter contribuído com esse achado.

Na análise de IGF-1 e IGFBP-3, a maioria dos participantes apresentou valores dentro dos padrões de normalidade. Todos os tipos de OI apresentaram escore-Z médio menor que zero e menores médias de IGF-1 e IGFBP-3 foram observadas na OI tipo III. Encontramos uma maior média para IGF-1 e IGFBP-3 no grupo com formas leves, mas sem significância estatística.

Na avaliação da variação da dosagem de IGF-1 e IGFBP-3 com os ciclos de tratamento, não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos. Apesar disso, o grupo A apresentou uma maior elevação de IGF-1 quando avaliado um ciclo da medicação e maior elevação do escore-Z de IGFBP-3 quando avaliados os um e dois ciclos das medicações.

Em um estudo sobre antropometria de 86 pacientes dinamarqueses com OI, observou-se que as concentrações médias de IGF-1 e IGFBP-3 estavam baixas, mas a maioria estava dentro dos valores de referência para idade e sexo. Também se observou que esses pacientes apresentavam tronco relativamente curto e desproporcionalidade nas medidas de circunferência da cabeça e comprimento do corpo (LUND; MULLER; SKOVBY, 1999).

Outro estudo transversal retrospectivo avaliou níveis séricos de IGF-1 e IGFBP-3 de 60 crianças com OI. Foram incluídas crianças com diagnóstico de OI tipo III e tipo IV. Essas crianças apresentavam níveis de IGF-1 e IGFBP-3 na faixa inferior da normalidade, porém sem diferenças estatísticas quando comparado o tipo de OI e sua influência nesses fatores de crescimento. Na comparação do tipo III com o tipo IV, encontrou valores significativamente menores para o peso e estatura na forma mais grave, OI tipo III (HOYER-KUHN et al., 2016).

Em nosso estudo, mesmo os pacientes com a forma grave da doença, OI tipo III, apresentam resultados de IGF-1 e IGFBP-3 dentro dos valores normais. Isso mostra que o eixo GH-IGF-1, provavelmente encontrava-se em normofuncionamento.

Sabe-se que os níveis de IGF-1 e IGFBP-3 dependem do estado nutricional e do estadio puberal do paciente (MARTINELLI; CUSTÓDIO; AGUIAR-OLIVEIRA, 2008; HOYER-KUHN et al, 2016). Como as crianças portadoras das formas graves de OI apresentam baixa estatura, e consequentemente redução da massa muscular em relação às crianças saudáveis, é esperado que apresentem níveis mais baixos de IGF-1. Também é importante levar em consideração o fato dessas crianças apresentarem fraturas recorrentes. A imobilização recorrente pode levar a um prejuízo da unidade funcional músculo-osso, o que também pode traduzir em prejuízo no crescimento (VEILLEUX et al., 2014; HOYER-KUHN et al., 2016).

Em geral, crianças com OI com idade superior a cinco anos não apresentam alterações significativas de IGF-I e IGFBP-3, e caso haja deve-se proceder com investigação de deficiência do hormônio do crescimento (HOYER-KUHN et al., 2016), e em nosso estudo, apenas duas crianças apresentava idade inferior a cinco anos no início do estudo, indivíduos A e E.

O indivíduo A, com idade de quatro anos e meio no primeiro tempo de coleta, apresentava IGF-1 e IGFBP-3 abaixo do escore-Z -2, entretanto nas dosagens seguintes com idade superior a cinco anos, houve normalização dos resultados. Para esse indivíduo foi considerada a análise do tempo 3, na qual tanto IGF-1 quanto IGFBP-3 já se encontravam normalizadas. O indivíduo E apresentava IGF-1 abaixo do escore-Z -2 nos três primeiros tempos. A partir do quarto tempo, com idade de quatro anos e dez meses, foram observados níveis dentro dos valores da normalidade. O indivíduo O, que na primeira coleta com idade de 5,75 anos (próximo aos 5 anos), apresentava concentrações de IGFBP-3 abaixo do z-escore -2. Nas coletas seguintes os resultados haviam normalizados. É importante levar em consideração que fizemos o ajuste do escore-Z pelo estadiamento puberal, e no EP 1 engloba

uma ampla variação de faixa etária, incluindo crianças com idade pré-escolar. Se fizéssemos o ajuste pelos valores da idade, provavelmente encontraríamos resultados diferentes, e provavelmente os indivíduos A, E e O apresentariam valores de escore-Z dentro da normalidade.

É conhecido o efeito anabólico do hormônio de crescimento (rGH) no osso. Um ensaio randomizado de 12 meses de seguimento, em pacientes com OI em uso de bisfosfonato (neridronato), com ou sem hormônio do crescimento, mostrou aumento de massa óssea e velocidade de crescimento nos pacientes em uso do GH. No entanto, é importante ressaltar, que o uso do hormônio de crescimento não está claramente estabelecido em pacientes com OI (ANTONIAZZI et al, 2010). Por se tratar de uma doença rara, há poucos estudos que retratam o eixo GH-IGF nessas crianças (HOYER-KUHN et al., 2016).

A avaliação do crescimento em pacientes com OI é um grande desafio, uma vez que não existem curvas de crescimento específicas para esta patologia. Estas curvas precisam ser desenvolvidas no intuito de averiguar se o crescimento de um paciente está adequado para o fenótipo que ele apresenta (HOYER-KUHN et al., 2016).

Seria interessante a avaliação subjacente molecular desses pacientes e seu impacto no crescimento, no entanto, não fez parte dos objetivos desse trabalho. Também não foram realizadas mais análises comparativas entre os subgrupos, tendo em vista o pequeno número de pacientes avaliados, que geram um fator limitante para evidenciar impacto na análise. Importante ressaltar que não avaliamos pacientes sem uso de bisfosfonatos.

5.3 Expressão gênica de RNAm de *RANKL*

Observamos que a expressão de RNAm de *RANKL* ficou abaixo do controle para a maioria dos indivíduos. De maneira oposta ao que observamos no *IGF1R*, a maior média ocorreu na OI tipo III e a menor na OI tipo I. Quando comparamos os tipos de OI agrupados conforme a gravidade, encontramos uma maior média no grupo com formas moderadas e graves (sem significância estatística).

Na comparação dos grupos de tratamento, a influência de um ou dois ciclos de tratamento não parece ter diferenças significativas nas variações das médias de expressão de *RANKL*. Apesar disso, observamos uma maior variação positiva desta expressão no grupo que recebeu ácido zoledrônico. A dúvida que levantamos seria se esse aumento da expressão possa ser em decorrência de uma tentativa de adaptação à inibição da ação dos osteoclastos pelo bisfosfonatos, cursando com aumento do *RANKL* como tentativa de diferenciação de novos osteoclastos.

Há poucos estudos na literatura que discorrem sobre expressão de *RANKL* em crianças com OI. Um estudo de um grupo italiano, com 18 crianças portadoras de OI, encontrou que os linfócitos expressam altas quantidades de *RANKL* e baixos níveis de *OPG*, mesmo em uso de bisfosfonato. Isso embasa a ideia de alto potencial osteoclastogênico das células mononucleares do sangue periférico de crianças com OI, o que sustenta a importância da neutralização do *RANKL* nos portadores de OI. Também mostrou que a medicação não influenciava nos níveis séricos de *RANKL*. O bisfosfonato usado no protocolo de tratamento daquele estudo foi o neridronato (BRUNETTI et al., 2016).

Os bisfosfonatos têm ação no processo de remodelação óssea, que está sob influência do sistema *RANK/RANKL/OPG*. Um estudo in vitro, com objetivo de demonstrar o impacto dos bisfosfonatos na expressão gênica de *RANKL* e *OPG* ao longo de 14 dias, evidenciou que bisfosfonatos que contêm nitrogênio levavam a um aumento da expressão gênica, após 48 horas de estimulação com altas doses dessas medicações, quando comparado ao grupo de bisfosfonato não nitrogenado e ao grupo controle sem estimulação. Esse estudo usou como bisfosfonatos o ácido zoledrônico e ibandronato, e cultura de células de osteoblastos humanas (KOCH et al., 2012).

Bisfosfonatos que contêm nitrogênio inibem enzimas da via do mevalonato, evitando assim a síntese de compostos isoprenóides, que são necessários para a modificação pós-traducional de proteínas de ligação a GTP. Essas GTPases controlam reguladores proteicos, possivelmente envolvidos na expressão gênica de *RANKL* e *OPG* (RUSSELL; ROGERS, 1999; ROGERS et al., 2000). Os medicamentos usados em nosso estudo, tanto o pamidronato quanto o ácido zoledrônico, são da classe dos bisfosfonatos nitrogenados.

A avaliação isolada do *RANKL* é deficitária no entendimento do processo de remodelação óssea. O ideal seria que em nosso estudo também fizéssemos a dosagem da expressão gênica de *OPG*, e usássemos a relação *RANKL/OPG* como um melhor preditor da atividade osteoclástica. Uma razão *RANKL/OPG* elevada parece ser contrária à renovação óssea visto na prática clínica, entretanto o que acontece é que essa alta relação pode levar à morte celular por apoptose dos osteoclastos e consequente renovação óssea, o que corroboraria com um aumento da densidade óssea (KOCH et al., 2012).

Também há de se relatar o fato da nossa avaliação ter acontecido num tempo aproximado de 17 semanas (quatro meses) após a exposição ao bisfosfonato, uma vez que a coleta ocorreu imediatamente antes da realização do ciclo subsequente da medicação. Não fizemos uma dosagem laboratorial em um tempo menor após a infusão da medicação.

Uma coorte prospectiva seguiu, por 18 meses, 11 pacientes com diagnóstico de doença de Paget. Estes foram pareados por idade, sexo e IMC com 12 indivíduos saudáveis. O estudo mostrou que os pacientes com doença de Paget apresentavam mensurações significativamente maiores de RANKL e OPG. Apesar de apresentar esses níveis elevados, esse aumento não foi atribuído ao efeito do ácido zoledrônico, bisfosfonato usado naquele estudo (POLYZOS et al., 2009).

É importante ressaltar a dificuldade de comparação dos dados referentes às expressões gênicas (*IGF1R* e *RANKL*) encontrados em nosso estudo com outros trabalhos, devido às diferenças metodológicas utilizadas.

5.4 Marcadores ósseos e bioquímicos

A maioria das dosagens de CTX encontrava-se abaixo dos limites inferiores de detecção do método. Os níveis de CTX são maiores no período matutino, portanto, recomenda-se que a coleta seja realizada pela manhã e em jejum (SZULC, 2018). Isso não ocorreu em nossas dosagens, já que essas eram realizadas por volta das 13h, antes da infusão da medicação. Junte-se a isso o fato dos bisfosfonatos reduzirem a reabsorção óssea e, conseqüentemente, os marcadores de reabsorção óssea como o CTX. Um estudo que avaliou o tratamento com ácido zoledrônico de pacientes com doença de Paget evidenciou redução dos níveis de CTX em uma análise de 18 meses de tratamento (POLYZOS et al., 2009).

O estudo do grupo italiano, citado anteriormente nesse trabalho, que comparou crianças com diagnóstico OI em tratamento com indivíduos hígidos, encontrou níveis de CTX mais baixos, sem significância estatística, no grupo dos tratados. E níveis de osteocalcina mais elevados nos indivíduos com OI em relação ao controle com significância estatística (BRUNETTI et al., 2016).

Na avaliação da osteocalcina, encontramos maiores médias nas crianças com diagnóstico de OI tipo I e a menor média nas crianças portadoras da forma mais grave, OI tipo III, mas sem significância estatística.

Referente influência de um ou dois ciclos de tratamento, não encontramos diferenças nas variações das médias de ambos os grupos, mas observamos uma maior queda no grupo tratado com ácido zoledrônico.

Fizemos apenas uma avaliação de fosfatase alcalina, que ocorreu próximo ao momento do primeiro tempo, no qual encontramos uma maior média no grupo com forma leve da doença. Não fizemos comparação dessa variável entre os grupos de tratamento. No entanto, é importante ressaltar estudo que comparou os tratamentos de ácido zoledrônico com

pamidronato, encontrou queda dos níveis séricos de FA em ambos os grupos de tratamento (BARROS et al., 2012). Pacientes com formas graves, em geral, iniciam tratamento mais cedo, e talvez nosso achado reflita a influência de anos de tratamento. Destacamos que o estudo citado e o nosso não avaliaram a FA específica óssea.

5.5 Tratamento da OI em crianças

O diagnóstico e o tratamento de paciente com OI avançaram muito nas últimas décadas. O tratamento com uso de bisfosfonatos endovenoso traz benefícios na taxa de fraturas e na densidade mineral óssea (PALOMO; VILAÇA; LAZARETTI-CASTRO, 2017). Isso leva à melhora na qualidade de vida, e novas questões entram em evidência, entre as quais a discussão das causas, formas de minimização da perda de estatura na OI e proposição de novos tratamentos.

Não foi foco do nosso estudo discorrer a respeito de segurança e eficácia dessas drogas, uma vez que, isso é bem descrito na literatura. Entretanto, é importante destacar alguns deles.

Os últimos estudos têm mostrado semelhante eficácia e segurança no uso do pamidrontato comparado ao ácido zoledrônico. Um estudo comparou o custo anual do ácido zoledrônico com o pamidronato, evidenciou uma economia maior que 50% no tratamento com ácido zoledrônico. Participaram 40 crianças, 20 em cada grupo, com o diagnóstico de OI leve e moderada. Esse estudo evidenciou que não houve diferenças entre os grupos quando se avaliava a densidade mineral da coluna lombar e a taxa de fraturas (SARAFF et al., 2017).

Em um estudo realizado na Universidade Federal de São Paulo, randomizado com 23 participantes, comparou a eficácia do pamidronato com o ácido zoledrônico. Encontrou melhoria na densitometria óssea quando avaliado o sítio lombar. Foram avaliados biomarcadores ósseos (CTX e osteocalcina), fósforo, PTH, ureia e creatinina, não encontrou diferenças entre os grupos. Também não encontrou sintomas clínicos graves em ambos os grupos (BARROS et al., 2012).

Em nosso estudo, à exceção do CTX e osteocalcina que foram avaliados no estudo longitudinal, fizemos apenas avaliação inicial das outras variáveis, comparando formas leves e moderadas/graves, não fizemos a comparação dos grupos que fizeram o uso do ácido zoledrônico e do pamidronato. Em nossos resultados não encontramos diferenças nas avaliações de eletrólitos (Cálcio total corrigido pelo valor da albumina, magnésio e fósforo), função renal (ureia e creatinina), transaminases (TGO e TGP) e albumina, quando comparamos o grupo com forma leve com o grupo com formas moderada e grave da doença.

Em nossos achados, que está de acordo com a literatura, encontramos menores médias de escores-z na DXA nas formas leves. É importante lembrar que o resultado do escore-Z pode refletir o tempo de tratamento prévio com bisfosfonatos desses indivíduos, e esta variável (tempo de tratamento) não fez parte de nossas análises.

Os dados aqui obtidos reforçam o tratamento com ácido zoledrônico como uma alternativa funcional válida ao pamidronato com redução do tempo e custo de internação e com impacto semelhante sobre a maioria das variáveis estudadas. Com relação ao eixo GH-sistema IGF as concentrações semelhantes de IGF-I e IGFBP-3 com os dois tipos de tratamento, associadas a maior expressão do *IGF1R* induzida pelo ácido zoledrônico, sugerem um aumento da atividade do IGF-1, que pode ser visto como positivo frente ao processo de formação óssea presente na OI.

As limitações que podem ser apontadas a este estudo se devem ao número pequeno de indivíduos participantes. Adicione-se a isso o fato de que alguns indivíduos, devido à pandemia do COVID-19, não puderam comparecer ao atendimento de rotina e tiveram que ser excluídos de parte da análise. Também é importante ressaltar que não avaliamos indivíduos com OI sem tratamento com bisfosfonatos e indivíduos hígidos. Mesmo assim, podemos afirmar que a influência do tratamento com ambas as medicações é semelhante em relação a maioria dos marcadores bioquímicos avaliados.

O aumento na expressão do *IGF1R* aqui relatado induzida pelo ácido zoledrônico, sem repercussão nas concentrações séricas de IGF-1 e IGFBP-3, sugere um facilitador de ação do IGF-1, entretanto, a escassez de trabalhos semelhantes na literatura dificulta uma conclusão mais assertiva, e mais estudos são necessários para melhor compreender a influência dos bisfosfonatos na expressão de *IGF1R*.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu-nos concluir que:

- Na análise das variáveis de acordo com o diagnóstico de OI, o menor comprometimento estatural foi observado na OI tipo I quando comparado a OI tipo III e OI tipo IV; entretanto, não foi constatada diferença significativa em relação aos demais parâmetros avaliados.

- Quando comparados indivíduos com forma leve de OI com aqueles com formas moderadas/ graves, maior comprometimento estatural, valores mais baixos de densitometria óssea e concentrações menores de FA foram observados nas formas moderadas/ graves da doença; entretanto, não foi constatada diferença significativa em relação aos demais parâmetros avaliados.

- A expressão média de RNAm de *IGF1R* em indivíduos com OI apresenta valores na faixa de normalidade quando comparada ao controle.

- As concentrações séricas de IGF-1 ou IGFBP-3 são normais para sexo e idade e semelhantes tanto nos indivíduos em uso de pamidronato quanto no grupo que houve substituição pelo ácido zoledrônico, não havendo variações significativas quando comparados os tratamentos com um ou dois ciclos da medicação.

- A expressão de RNAm *RANKL* e as concentrações séricas de osteocalcina não se alteram após um ou dois ciclos do tratamento com ácido zoledrônico em crianças previamente tratadas com pamidronato. Não foi possível realizar avaliação do CTX devido à quantidade de amostras indetectáveis.

- Os resultados sugerem aumento da expressão do *IGF1R* após dois ciclos do tratamento com ácido zoledrônico em crianças previamente tratadas com pamidronato.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AITCHISON, K. et al. Homozygous osteogenesis imperfecta unlinked to collagen I genes. **Human Genetics**, v. 78 p. 233-236, 1988. DOI: 10.1007/BF00291667
- ALCAUSIN, M.B. et al. Intravenous Pamidronate Treatment in Children with Moderate-to-Severe Osteogenesis Imperfecta Started under Three Years of Age. **Horm Res Paediatr**, v. 79, n. 6 p. 333-340, 2013. DOI: 10.1159/000351374
- ANTONIAZZI, F. et al. GH in combination with bisphosphonate treatment in osteogenesis imperfecta. **Eur J Endocrinol**, v.163, n. 3, p. 479-487, 2010. DOI: 10.1530/EJE-10-0208
- BACHRACH. L.K; WARD, L.M. Clinical review: Bisphosphonate use in childhood osteoporosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 2, p. 400-409, 2009. DOI: 10.1210/jc.2008-1531
- BALJET, B. Aspects of the history of Osteogenesis imperfecta (Vrolik's syndrome). **Ann Anat**, v. 184, n. 1, p. 1-7, 2002. DOI: 10.1016/S0940-9602(02)80023-1.
- BARROS, E.R; SARAIVA, G.L; OLIVEIRA, T.P; LAZARETTI-CASTRO, M. Safety and efficacy of a 1-year treatment with zoledronic acid compared with pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. **J Pediatr Endocr Met**, v. 25, n. 5-6, p. 485–491, 2012. DOI: 10.1515/jpem-2012-0016
- BEN AMOR, I.M. et al. Skeletal Clinical Characteristics of Osteogenesis Imperfecta Caused by Haploinsufficiency Mutations in COL1A1. **J Bone Miner Res**, V. 28, n. 9, p. 2001-2007. 2013. DOI: 10.1002/jbmr.1942
- BONAFE, L. et al. Nosology and Classification of Genetic Skeletal Disorders: 2015 Revision. **Am J Med Genet Part A**, v. 167, p.2869-2892, 2015. DOI 10.1002/ajmg.a.37365
- BROWN, R.J. et al. Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. **Nat Struct Mol Biol**, v.12, n. 9, p. 814-21, 2005. DOI: 10.1038/nsmb977
- BRUNETTI, G. et al. Impaired bone remodeling in children with osteogenesis imperfecta treated and untreated with bisphosphonates: the role of DKK1, RANKL, and TNF- α . **Osteoporos Int**, v. 7, n. 7, p. 2355-2365, 2016. DOI: 10.1007/s00198-016-3501-2
- BYERS, P.H; STEINER, R.D. Osteogenesis imperfecta. **Annual Review of Medicine**, v. 43, p. 269-282, 1992. DOI: 10.1146/annurev.me.43.020192.001413
- CASTRO, L.C G. **Considerações sobre a massa óssea: do nascimento à senescência**. In: MAEDA, S. S; SILVA D. M. W. (Ed). Guia prático em Osteometabolismo. 1ª ed. São Paulo – Seguimento Farma, 2014. cap. 1, p. 1-14.
- CHEUNG, M.S; GLORIEUX, F.H. Osteogenesis Imperfecta: update on presentation and management. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 9, n. 2, p. 153-160, 2008. DOI: 10.1007/s11154-008-9074-4

CUSTODIO, R.J. et al. Impact of hypoxia on IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, ALS and IGFBP-1 regulation and on *IGF1R* gene expression in children. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 22, n. 5, p. 186-191, 2012. DOI: 10.1016/j.ghir.2012.07.001

DARRIGO, E.R. **Estudo da associação de tecido medular ósseo, massa óssea e expressão do receptor tipo 1 dos IGFs em crianças e adolescentes obesos**. 2017. 59 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

DEVOGELAER, J.P. et al. Radiological manifestations of bisphosphonate treatment with APD in a child suffering from osteogenesis imperfecta. **Skeletal Radiol**, v. 16, n. 5, p. 360-363, 1987. DOI: 10.1007/BF00350961.

FANG, Y. et al. Calycosin stimulates the osteogenic differentiation of rat calvarial osteoblasts by activating the IGF1R/PI3K/Akt signaling pathway. **Cell Biology International**, v. 43, p. 323-332, 2019. DOI: 10.1002/cbin.11102

FOLKESTAD, L. et al. Mortality and Causes of Death in Patients With Osteogenesis Imperfecta: A Register-Based Nationwide Cohort Study. **J Bone Miner Res**, v. 31 n. 12, p. 2159-2166, 2016. DOI: 10.1002/jbmr.2895

FORLINO, A. et al. New Perspectives on Osteogenesis Imperfecta. **Nat Ver Endocrinol**, v. 7 n. 9, p. 540-557, 2012. DOI: 10.1038/nrendo.2011.81

FORLINO, A; MARINI J.C. Osteogenesis imperfecta. **Lancet**, v. 387, n. 10028 p. 1657-1671, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00728-X

GLORIEUX, F.H. Osteogenesis Imperfecta. **Best Practice and Research Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 1, p. 85-100, 2008. DOI: 10.1016/j.berh.2007.12.012

HOYER-KUHN, H; HOBING, L; CASSENS, J; SCHOENAU, E; SEMLER, O. Children with severe Osteogenesis imperfecta and short stature presente on average with normal IGF-1 and IGFBP-3 levels. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 29, n. 7, p. 813-818, 2016. DOI: 10.1515/jpem-2015-0385

JONES, J.I; CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr Rev**, v. 16, n. 1, p. 3-34, 1995. DOI: 10.1210/edrv-16-1-3

KOCH, F.P. et al. Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. **Clin Oral Invest**, v. 16, n. 1 p. 79-86, 2012. DOI: 10.1007/s00784-010-0477-8

KOFOED, E.M. et al. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. **N Engl J Med**, v. 349, p. 1139-1147, 2003. DOI: 10.1056/NEJMoa022926

KOHLI, S.S; KOHLI, V.S. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 15, n. 3, p. 175-181, 2011. DOI: 10.4103/2230-8210.83401

LETOCHA, A.D. et al. Controlled trial of pamidronate in children with types III and IV osteogenesis imperfecta confirms vertebral gains but not short-term functional improvement. **J Bone Miner Res**, v. 20, n.6, p. 977-986, 2005. DOI: 10.1359/JBMR.050109

LIM, J. et al. Genetic causes and mechanisms of osteogenesis imperfecta. **Bone**, v. 102 p. 40-49, 2017. DOI: 10.1016/j.bone.2017.02.004

LINDAHL, K. et al. Genetic epidemiology, prevalence, and genotype–phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, n.8, p. 1042–1050, 2015. DOI: 10.1038/ejhg.2015.81

LUND, A.M; MULLER, J; SKOVBY, F. Anthropometry of patients with osteogenesis imperfecta. **Arch Dis Child**, v. 80, n.6, p. 524–528, 1999. DOI: 10.1136/ad.80.6.524

MACHOL, K. et al. Hearing loss in individuals with osteogenesis imperfecta in North America: Results from a multicenter study. **Am J Med Genet**, v. 182, n. 4, p. 697-704, 2019. DOI: 10.1002/ajmg.a.61464

MARINI, J.C. Osteogenesis imperfecta. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 1-19, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.52.

MAROM, R; RABENHORST, B.M; MORELLO, R. Osteogenesis imperfecta: an update on clinical features and therapies. **European Journal of Endocrinology**, v. 183, n. 4, p. 95-106, 2020. DOI: 10.1530/EJE-20-0299

MARTINELLI, J.R.C.E; CUSTÓDIO, R.J; AGUIAR-OLIVEIRA, M.H. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 5, p. 717-725, 2008. DOI: 10.1590/S0004-27302008000500002.

MCALLION, S.J; PATERSON, C.R. Causes of death in osteogenesis imperfecta. **J Clin Pathol**, v. 49, n.8, p. 627-630, 1996. DOI: 10.1136/jcp.49.8.627

MCCLUNG. M. et al. Bisphosphonate Therapy for Osteoporosis: Benefits, Risks, and Drug Holiday. **The American Journal of Medicine**, v. 126, n. 1, p. 13-20, 2013. DOI: 10.1016/j.amjmed.2012.06.023

MILANI, S.L.S. **Caracterização clínica e laboratorial de crianças e adolescentes com insensibilidade parcial ao Hormônio de Crescimento ou IGF-1**. 2009. 105 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MORTIER, G.R, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. **Am J Med Genet Part A**, n.179, v.12, p. 1-27, 2019. DOI: 10.1002/ajmg.a.61366

NILSSON, O; MARINO, R; DE LUCA, F; PHILLIP, M; BARON, J. Endocrine Regulation of the Growth Plate. **Horm Res**, v. 64, n. 4, p. 157-165, 2005. DOI: 10.1159/000088791

PALOMO, T; VILAÇA, T; LAZARETTI-CASTRO, M. Osteogenesis Imperfecta diagnosis and treatment. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 24, n.6, p. 381-388, 2017. DOI: 10.1097/MED.0000000000000367

PALOMO, T. et al. Intravenous Bisphosphonate Therapy of Young Children with Osteogenesis Imperfecta: Skeletal Findings During Follow Up Throughout the Growing Years. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 12, p. 2150-2157, 2015. DOI: 10.1002/jbmr.2567

PATERSON, C.R; MCALLION, S; STELLMAN, J.L. Osteogenesis imperfecta after menopause. **The New England Journal of Medicine**, v. 310, n. 26, p. 1694-1696, 1984. DOI: 10.1056/NEJM198406283102602

PHILLIPI, C.A; REMMINGTON, T; STEINER, R.D. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, n.4, p. 1-34, 2008. DOI: 10.1002/14651858.CD005088.pub2

POLYZOS, S.A. et al. The Effect of Zoledronic Acid on Serum Dickkopf-1, Osteoprotegerin, and RANKL in Patients with Paget's Disease of Bone. **Horm Metab Res**, v. 41, n. 11, p. 846 – 850, 2009. DOI: 10.1055/s-0029-1233491

PROCKOP, D.J. et al. Mutation in type 1 procollagen that cause osteogenesis imperfecta: effects of the mutations on assembly of collagen into fibrils, the basis of phenotypic variations, and potencial antisense therapies. **J of Bone and Mineral Research**, v. 8, f. 2, p. 489-492, 1993. DOI: 10.1002/jbmr.5650081311

RAUCH, F. et al. Static and Dynamic Bone Histomorphometry in Children With Osteogenesis Imperfecta. **Bone**, v. 26, n. 6, p. 581-589, 2000. DOI: 10.1016/s8756-3282(00)00269-6.

RAUCH, F; TRAVERS, R; PLOTKIN, H; GLORIEUX, F.H. The effects of intravenous pamidronate on the bone tissue of children and adolescents with osteogenesis imperfecta. **J Clin Invest**, v.110, n, 9, p. 1293– 1299, 2002. DOI: 10.1172/JCI15952

RAUCH, F; GLORIEUX, F.H. **Osteogenesis imperfecta**. *Lancet*, v. 363, n. 9418, p.1377-1385, 2004. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16051-0

RAUCH, F; GLORIEUX, F.H. Treatment of children with osteogenesis imperfecta. **Curr Osteoporos Rep**, v. 4, p. 159-164, 2006. DOI: 10.1007/s11914-996-0025-2

RICCO, R.C. et al. IGF-1R mRNA expression is increased in obese children. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 39, p. 1-5, 2018. DOI: 10.1016/j.ghir.2017.11.001

ROGERS, M.J. et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Cancer**, v. 88, p. 2961–2978, 2000. DOI: 10.1002/1097-0142(20000615)88:12

RUSSELL, R.G; ROGERS, M.J. Bisphosphonates: From the Laboratory to the Clinic and Back Again. **Bone**, v. 25, n. 1, p. 97–106, 1999. DOI: 10.1590/S1415-54192008000400003

SANTILI, C. et al. Avaliação Clínica, Radiográfica e Laboratorial de pacientes com Osteogênese Imperfeita. **Rev Assoc Med Bras**, v. 51, n. 4, p. 214-220, 2005. Available from: <https://www.scielo.br/pdf/ramb/v51n4/a18v51n4.pdf>

SARAFF, V; SAHOTA, J; CRABTREE, N; SHAW, N; HOGLER, W. Efficacy and treatment costs of zoledronate versus pamidronate in paediatric osteoporosis. **Arch Dis Child**, p. 1-3, 2017. DOI: 10.1136/archdischild-2017-313234

SARTI DE PAULA, M.T.A. **Estudo da expressão do *IGF1R* mRNA em meninas com puberdade precoce central antes e durante o tratamento com análogo do GnRH.** 2015. 89 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

SEGRETIN, M.E. et al. Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Regulation in Activated Human T Lymphocytes. **Horm Res**, v. 59, n. 6, p. 276–280, 2003. DOI: 10.1159/000070625

SEMLER, O. et al. A Mutation in the 50-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, n. 2, p. 349-357, 2012. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.06.011.

SILLENCE, D.O; SENN, A; DANKS, D.M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. **J Med Genet**, v. 16 n. 2, p. 101-116, 1979. 10.1136/jmg.16.2.101

SJOGREN, K. et al. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n. 12, p. 7088-7092, 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.12.7088

SZULC, P. Bone turnover: Biology and assessment tools. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 32, n. 5, p. 725-738, 2018. DOI: 10.1016/j.beem.2018.05.003

THIBEAULT, D.W; PETTETT, G; MABRY, S.M.; REZAIEKHALIGH, M.M. Osteogenesis imperfecta Type IIA and pulmonary hypoplasia with normal alveolar development. **Pediatr Pulmonol**, v. 20, n. 5, p. 301-306, 1995.DOI: 10.1002/ppul.1950200508

TOURNIS, S; DEDE, A.D. Osteogenesis Imperfecta – A Clinical Update. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 80, p.27-37, 2018. DOI: 10.1016/j.metabol.2017.06.001

TREJO, P; RAUCH, F. Osteogenesis imperfecta in children and adolescents-new developments in diagnosis and treatment. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 12, p. 3427–3437, 2016. DOI: 10.1007/s00198-016-3723-3

VAN DER EERDEN, B.C.J; KARPERIEN, M; WIT, J.M. Systemic and Local Regulation of the Growth Plate. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 6, p. 782–801, 2003. DOI: 10.1210/er.2002-0033

VAN DIJK, F.S; SILLENCE, D.O. Osteogenesis Imperfecta: Clinical Diagnosis, Nomenclature and Severity Assessment. **Am J Med Genet Part A**, v. 164, n. 6, p. 1470-1481, 2014. DOI: 10.1002/ajmg.a.36545

VEILLEUX, L.N et al. Muscle anatomy and dynamic muscle function in osteogenesis imperfecta type I. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 2, p. 356-362, 2014. DOI: 10.1210/jc.2013-3209

VILAÇA, T; LAZARETTI-CASTRO, M. **As células ósseas e suas inter-relações na fisiologia óssea.** In: MAEDA, S. S; SILVA D. M. W. (Ed). Guia prático em Osteometabolismo. 1. ed. São Paulo: Seguimento Farma, 2014. p. 15-24.

WALLIS, G.A et al. Osteogenesis imperfecta type III: mutations in the type I collagen structural genes, COL1A1 and COL1A2, are not necessarily responsible. **J of Medical Genetics**, v. 30, n. 6, p. 492–496, 1993. DOI: 10.1136/jmg.30.6.492

WERNER, H; SARFSTEIN R. Transcriptional and epigenetic control of *IGF1R* gene expression: Implications in metabolism and câncer. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 24, n. 4, p. 112-118, 2014. DOI: 10.1016/j.ghir.2014.03.006

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Growth Reference Data for 5-19 years**, 2007. Disponível em: <<https://www.who.int/tools/growth-reference-data-for-5to19-years/application-tools/>>. Acesso em 05 de ago. de 2020.

YAKAR, S. et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. **J Clin Invest**, v. 110, f. 6, p. 771-781, 2002. DOI: 10.1172/JCI15463

ZIMMERMAN S.M. et al. Loss of RANKL in osteocytes dramatically increases cancellous bone mass in the osteogenesis imperfecta mouse (oim). **Bone Reports**, v. 9, p. 61-73, 2018. doi: 10.1016/j.bonr.2018.06.008

Apêndice

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA E PUERICULTURA

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR EM PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO DO ESTUDO: “Expressão de *IGF1R* em pacientes com Osteogênese Imperfeita em uso de Bisfosfonatos e em Indivíduos hígidos nos diferentes estágios puberais”.

DATA DO CONSENTIMENTO:**PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:**

Guilherme Manso de Lima

- e mail: guilhermemansolima@usp.br

- cel: (16) 98260-2887

Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Junior

- e-mail: cemart@fmrp.usp.br

- tel: (16) 3602-2711

NOME DO VOLUNTÁRIO:

O (a) seu filho (a) está sendo convidado para ser voluntário em um estudo de pesquisa clínica. Os estudos de pesquisa clínica incluem apenas pessoas que aceitam participar voluntariamente. A decisão de participação na pesquisa deverá ser feita após você e o (a) seu filho (a) terem pleno conhecimento sobre os riscos e benefícios envolvidos e então tomar uma decisão que lhe seja adequada. Este processo é conhecido como consentimento informado. Por favor, reflita para tomar uma decisão.

O (a) seu filho (a) está sendo convidado para participar deste estudo porque preenche os critérios de inclusão da pesquisa. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo.

POR QUE ESTE ESTUDO SERÁ REALIZADO?

Queremos saber a influência da medicação que seu filho (a) faz uso (pamidronato) no sistema relacionado ao crescimento dos ossos. Ao investigar a expressão de *IGF1R*,

possibilitar desenvolvimento futuro de novas medicações que possibilitem maior ganho de estatura e melhora na qualidade da matriz óssea. Ao implementar uma medicação com melhor custo-benefício, o ácido zoledrônico permite maior facilidade posológica, que encurta o período de internação, melhorando qualidade de vida do paciente e reduzindo os custos hospitalares.

QUAIS INDIVÍDUOS FARÃO PARTE DESTE ESTUDO CLÍNICO?

Os participantes dessa pesquisa serão as crianças com diagnóstico de Osteogênese Imperfeita que fazem seguimento no Ambulatório de Doenças Ósseas Infantis do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) e que realizam internações periódicas para receberem a medicação pamidronato.

O QUE ESTÁ ENVOLVIDO NESTE ESTUDO?

Na participação do seu (a) filho (a) no referido estudo, será colhido entre 5 e 10 ml de sangue, equivalente a aproximadamente a uma a duas colheres de sopa, antes da dose da medicação (pamidronato ou ácido zoledrônico). As crianças serão sorteadas em dois grupos, sendo que o primeiro receberá pamidronato e o segundo ácido zoledrônico. Serão realizadas aproximadamente cinco coletas de sangue no período do estudo: oito meses em análise do pamidronato (exame já coletados) e oito meses em uso de pamidronato ou ácido zoledrônico conforme randomização. Lembrando que não aumentará o número de punções (picadas) que seu filho (a) já recebe, uma vez que já são coletadas amostras antes da infusão do pamidronato. Após análise, as amostras de sangue serão descartadas.

Também serão feitos exames para ver a qualidade óssea, a densitometria óssea de corpo total e coluna lombar (exame já realizado periodicamente em seu filho – já faz parte do nosso protocolo de seguimento). A quantidade de raios-X emitida nos exames de densitometria óssea e coluna vertebral são pequenas, pois os aparelhos utilizados reduzem a exposição à radiação. Todos os exames serão supervisionados por, pelo menos, um pesquisador deste estudo, estando o (a) seu filho (a) sob os cuidados de um médico, caso seja necessária alguma intervenção de emergência.

COMO DE REALIZARÁ O PROTOCOLO DE INFUSÃO DAS DROGAS?

A medicação pamidronato poderá ser substituída pelo ácido zoledrônico se seu filho fizer parte do grupo do ácido zoledrônico. Essa medicação já é realizada em alguns centros de estudo no mundo. Essa substituição poderá ajudar a modificar o protocolo atual. O ácido zoledrônico será administrado a cada quatro meses, seus ciclos duram apenas um dia (enquanto no pamidronato são dois dias) e a medicação é infundida em 50 minutos (enquanto no pamidronato são três horas), o que encurta o período de internação e consequentemente poderá haver melhora na qualidade de vida do paciente e redução dos custos hospitalares. Realizemos comparação de exames laboratoriais com o uso das duas medicações.

QUAIS OS RISCOS DESTE ESTUDO DE PESQUISA?

Os riscos neste estudo de pesquisa são relacionados a coleta de sangue da sua veia, e exames de imagem. A picada da agulha pode causar uma dor passageira e o (a) seu filho (a) poderá ter uma mancha e dor no local por alguns dias. Em relação à densitometria óssea, a quantidade de raios-X emitida nos exames de densitometria óssea e coluna vertebral são pequenas, pois os aparelhos utilizados reduzem a exposição à radiação.

Há também os riscos devido ao uso das medicação ácido zoledrônico, que são os mesmos descritos com o pamidronato (que os pacientes já fazem uso), entre os quais podemos destacar: agitação, confusão, convulsão, depressão, tonteira, febre, cefaleia (dor de cabeça), calafrios, dor óssea, náusea, vômitos, diarreia, dor abdominal, anorexia, hipotensão (redução

da pressão arterial), alergia, asma, tosse, dispneia (falta de ar), urticária, alterações hematológicas, disfunção renal, hipocalcemia(cálcio baixo), hipomagnesemia (magnésio baixo) e hipofosfatemia (fósforo baixo). Como o paciente receberá a infusão das drogas em ambiente hospitalar, caso apresente alguma dessas intercorrências, receberá imediato atendimento médico.

EXISTEM BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DESTES ESTUDO CLÍNICO?

Não existem benefícios diretos para o (a) seu (sua) filho (a) em participar deste estudo de pesquisa. Porém, sua participação poderá ajudar a implementação de uma medicação de uma geração mais nova (como está acontecendo em outros centros).

QUAIS AS OUTRAS OPÇÕES QUE EXISTEM?

O (a) seu filho (a) ou o responsável pode decidir por não participar desse estudo e não terá nenhum efeito sobre qualquer aspecto em atendimento no HC-FMRP.

SOBRE A CONFIDENCIALIDADE?

Esforços serão feitos para manter suas informações pessoais confidenciais. Os resultados dos testes realizados com o sangue do (a) seu filho (a) serão mantidos completamente anônimo e confidencial. Os resultados serão mantidos em segurança em computadores protegidos por senha. Todas as informações serão codificadas e nenhum identificador pessoal será armazenado.

QUAIS SÃO OS CUSTOS?

Não existe nenhum custo para o (a) seu filho (a) se o (a) seu filho (a) participar deste estudo.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO UM PARTICIPANTE?

Você pode escolher não participar ou pode deixar de participar do estudo a qualquer momento. Deixar de participar do estudo não resultará em nenhuma penalidade ou perda de benefícios que o (a) senhor (a) tem direito. Também poderá retirar seu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar. E se desejar sair da pesquisa, seu (sua) filho (a) também não terá qualquer prejuízo à assistência que vem recebendo.

QUEM VERÁ ESTAS INFORMAÇÕES DESSE ESTUDO?

Os investigadores envolvidos no estudo terão acesso às suas informações. O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto ou Agências regulatórias de pesquisa poderão ver partes de seus dados médicos relatados neste estudo e, portanto, verão seu nome ou outras informações de identificação pessoal sobre o (a) seu filho (a). As informações coletadas são propriedades do Investigador. No caso de qualquer publicação referente a este estudo, sua identificação não será revelada.

AS INFORMAÇÕES COLETADAS COMO PARTE DESTES ESTUDO SERÃO DESTRUÍDAS QUANDO NÃO FOREM MAIS NECESSÁRIAS?

É difícil para o Investigador saber quanto tempo suas informações serão mantidas, mas comumente elas serão mantidas em banco de dados do Investigador por um período de tempo indefinido. Nós não sabemos quando suas informações não serão mais utilizadas, e não existe uma expiração das informações após elas serem descartadas.

EU POSSO INTERROMPER MINHAS INFORMAÇÕES APÓS ELAS COMEÇAREM A SER UTILIZADAS?

Se o (a) seu filho (a) deixar o estudo, e não desejar ter mais nenhuma informação pessoal coletada, deverá notificar por escrito ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Junior, por meio de carta enviada para Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto SP ou pelo telefone (16) 3602-2711. Qualquer informação já coletada continuará a ser vista e usada como descrito previamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Caso aconteça algo errado ou tenha alguma dúvida, entrar em contato com o pesquisador Guilherme Manso de Lima, pelo telefone (16) 98260-2887 ou e-mail guilhermemansolima@usp.br.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação. Não haverá ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa (exemplo: transporte e alimentação).

Tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, gostaríamos que assinasse o consentimento do seu (a) filho (a) para participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação.

O participante da pesquisa será devidamente indenizado, conforme leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente de participação na pesquisa. Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) (16) 3602-2228.

OBSERVAÇÃO: Documento em duas vias, uma para o participante da pesquisa, outra para o pesquisador responsável. Todas as páginas serão rubricadas e a última assinada pelo participante ou responsável e pelo pesquisador;

Responsável legal

Nome do responsável legal _____

Assinatura Responsável legal _____

Local e data: Ribeirão Preto, ____/____/____.

Pesquisador que obteve o TCLE:

Nome do pesquisador que obteve o TCLE: _____

Assinatura do pesquisador que obteve o TCLE: _____

Local e data: Ribeirão Preto, ____/____/____

Pesquisador Responsável:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Martinelli Junior

Departamento de Puericultura e Pediatria, FMRP-USP.

Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, SP, Brasil

Fone: 16 3602-2575

Ribeirão Preto, ____ de ____ de ____.

APÊNDICE B - Termo de Assentimento (TA)

TERMO DE ASSENTIMENTO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO-USP
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA E PUERICULTURA

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR EM PROJETO DE PESQUISA

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Expressão de *IGF1R* em pacientes com Osteogênese Imperfeita em uso de Bisfosfonatos e em Indivíduos hígidos nos diferentes estágios puberais”.

Seus pais permitiram que você participe.

Os participantes dessa pesquisa serão as crianças com diagnóstico de Osteogênese Imperfeita que fazem seguimento no Ambulatório de Doenças Ósseas Infantis do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) e que realizam internações periódicas para receberem a medicação pamidronato.

Queremos saber a influência da medicação que você faz uso (pamidronato) no sistema relacionado ao crescimento dos ossos. E isso poderá permitir avaliar, no futuro, o uso de medicações que possam ajudar no crescimento de crianças que apresentam o mesmo problema que você.

Você poderá ter sua medicação mudada para ácido zoledrônico. Essa medicação já é realizada em alguns centros de estudo no mundo. A substituição do pamidronato pelo ácido zoledrônico pode ajudar a modificar o que atualmente usamos aqui em Ribeirão Preto. O uso dessa medicação poderá reduzir o tempo de internação e aumentar o intervalo entre as internações para o tratamento. Os riscos da medicação ácido zoledrônico descritos são praticamente os mesmos do pamidronato.

Será coletado um pouco mais de sangue que já é colhido atualmente quando você interna para fazer a medicação, cerca de uma a duas colheres de sopa a mais. A realização desse exame é segura, mas é possível que a picada da agulha possa causar uma dor passageira e você poderá ter uma mancha e dor no local por alguns dias (como já acontece nas coletas dos exames atuais).

Também será realizada Densitometria óssea. Este exame não causa dor.

Todos os exames serão supervisionados por, pelo menos, um pesquisador deste estudo. A sua participação poderá ajudar outros indivíduos no futuro com os resultados e conhecimentos obtidos a partir deste estudo.

Caso aconteça algo errado, seus pais entrarão em contato com a nossa equipe. Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem

daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças ou adolescentes que participarem.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar agora ou durante o decorrer do estudo.

Você entendeu o que de bom e de ruim que podem acontecer? Se sim e concordar em participar do estudo, solicitamos que assine abaixo. Se você optar por não participar, não tem nenhum problema, ninguém ficará bravo com você ou seus pais. Também pode desistir quando quiser. Conseguimos tirar suas dúvidas? Se tiver interesse, peço que assine abaixo a autorização.

Assinatura _____ do _____ menor
alfabetizado _____
Ribeirão Preto, ____ de ____ de ____.

APÊNDICE C - Descrição das variáveis clínicas e laboratoriais de cada indivíduo por tempo de coleta

Descrição das variáveis clínicas e laboratoriais de cada indivíduo no tempo 1 de coleta, Ribeirão Preto, 2021

Indivíduo	Idade (anos)	Estatura (Ze)	IMC (Ze)	IGF-1 (Ze)	IGFBP-3 (Ze)	<i>IGF1R</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	<i>RANKL</i> ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	Osteocalcina (ng/ml)
A	4,5	-6,58	-0,39	-2,15	-2,16	*	*	32,5
B	6,42	-4,77	-0,98	-1,43	0,4	1,42002	0,81938	34
C	6,66	-4,66	1,92	-1,58	-0,9	1,58102	1,84594	53,9
D	8	-5,67	1,75	-0,96	-2,02	0,03316	0,78252	37,8
E	3,25	-3,07	0,37	-2,42	-0,85	2,40734	4,34676	28,5
F	6,42	-2,48	0,89	-0,55	0,32	1,72395	0,90233	43,7
G	6,92	-1,77	0,75	-0,62	-0,6	1,45959	0,98662	56,7
H	12	-5,28	-0,23	-0,42	-0,53	1,61116	0,64981	45,8
I	12,33	-4,23	0,27	-0,78	-0,74	0,89087	0,75329	54,8
J	13,83	-1,99	0,58	-1,17	-0,7	1,33661	0,58889	52,3
K	14,75	-2,87	1,31	1,44	-1,39	1,02453	0,61684	46,8
L	11,75	-3,97	-0,17	-1,47	-0,16	1,52868	0,55125	72,7
M	5	-0,61	0,44	-0,21	0,35	2,22094	0,72859	46,4
N	5,5	-0,95	1,92	-1,12	0,46	1,33622	0,72455	40,2
O	5,75	-0,34	0,72	-0,86	-2,85	1,32552	1,02531	50,6
P	8,42	-1,98	-1,96	-1,04	-0,95	1,40156	0,72446	49,9
Q	8,58	-1,13	-1,41	-0,01	0,66	1,07081	0,85899	81,7
R	9,83	-1,51	3,32	-0,24	-0,02	2,29966	0,57453	34,7
S	10,42	-1,68	0,43	-2,1	-0,6	1,20649	0,63875	75,1
T	11,58	-0,93	0,07	-0,21	-1,44	2,08976	0,85698	149
U	14,33	-0,39	-1,39	-0,62	-1,22	2,55867	0,54749	55,3

Ze: escore-Z.

* Não foi possível realização de expressão gênica de RNAm de *IGF1R* e *RANKL*, uma vez que não conseguiu amplificação da amostra para PCR em tempo real.

Descrição das variáveis clínicas e laboratoriais de cada indivíduo no tempo 2 de coleta, Ribeirão Preto, 2021

Indivíduo	Idade (anos)	Estatura (Ze)	IMC (Ze)	IGF-1 (Ze)	IGFBP-3 (Ze)	IGF1R ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	RANKL ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	Osteocalcina (ng/ml)
A	5,25	-6,78	-0,7	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC
B	6,75	-4,75	-0,69	-1,46	0,91	2,14861	1,12148	29,5
C	7,6	-5,1	1,93	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC
D	8,67	-5,41	1,56	-0,43	-1,77	1,68761	1,15908	35,8
E	4,25	-3,03	0,24	-2,75	-0,93	1,34857	1,05477	30
F	6,75	-2,49	0,72	-1,23	0,14	1,46518	0,32445	32,7
G	7,58	-1,77	0,47	-0,73	-0,76	1,51844	0,32121	39,6
H	12,42	-5,12	-0,75	-0,01	-0,62	2,16532	0,4259	63,7
I	12,75	-4,41	0,41	-0,99	-0,35	1,59425	0,525	66,5
J	14,17	-2,14	0,98	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC
K	15,17	-2,93	1,39	0,86	-1,51	1,71196	0,50005	40,8
L	12,08	-4,07	0,13	-0,75	1,27	1,43449	1,06507	83,9
M	5,33	-0,47	1,07	-0,27	1,68	2,54629	1,02059	101
N	5,83	-1,2	1,51	-1,23	-0,06	1,5233	0,82085	36,8
O	6,08	-0,04	1,44	NCC	NCC	NCC	NCC	NCC
P	8,75	-2,04	-2,02	-0,95	-0,5	2,26784	0,39415	72
Q	9	-0,97	-0,07	0,44	0,38	0,70277	0,19528	131
R	10,17	-1,39	3,02	0,5	1,06	1,75032	0,74702	71,6
S	10,75	-1,7	0,68	-1,37	0,43	1,19996	0,91858	64,5
T	---	---	---	---	---	---	---	---
U	14,67	-0,45	-1,36	-0,04	-0,43	1,94446	0,4668	55,7

Ze: escore-Z; NCC: Não conseguiu coleta.

Descrição das variáveis clínicas e laboratoriais de cada indivíduo no tempo 3 de coleta, Ribeirão Preto, 2021

Indivíduo	Idade (anos)	Estatura (Ze)	IMC (Ze)	IGF-1 (Ze)	IGFBP- 3 (Ze)	IGF1R (2^{-ΔΔCT})	RANKL (2^{-ΔΔCT})	Osteocalcina (ng/ml)
A	5,58	-6,79	-0,58	-1,65	-1,36	1,64695	1,09832	34,2
B	7,25	-4,75	-0,67	-1,01	0,83	1,69676	0,94264	27,9
C	7,83	-5,16	1,86	-1,74	-0,2	2,05008	0,51057	40,9
D	9	-5,33	1,86	0,15	-1,3	2,28099	1,11586	37,8
E	4,5	-2,95	0,37	-2,26	-0,38	1,62547	0,91216	29,7
F	7,08	-2,43	0,75	-0,62	0,97	1,73659	0,4589	39,3
G	8,25	-1,9	0,27	0,06	0,28	1,3746	0,42884	56,5
H	12,67	-5,16	-0,74	1,26	0,21	1,1434	0,50956	69,6
I	13,5	-4,85	0,84	0,04	0,06	1,34839	0,39756	63,1
J	14,42	-2,23	0,92	0,06	0,14	1,7688	0,28833	59,4
K	15,5	-3,11	1,66	0,09	-0,74	1,10503	0,87423	41,6
L	12,5	-4,2	-0,04	-0,84	1,32	1,77957	0,26453	52,3
M	5,67	-0,38	1,62	0,41	1,84	2,01298	0,39402	84,6
N	6,17	-1,14	1,67	-0,9	0,82	1,20675	0,87304	46,3
O	6,42	-0,14	1,17	-0,45	0,55	1,4351	0,62466	55,9
P	9,25	-2,36	-1,75	-1,19	-0,05	2,50795	0,49414	47
Q	9,33	-0,83	0,24	1,82	2,08	0,94702	0,623	85,6
R	10,5	-1,55	2,98	0,26	0,6	1,80534	1,05978	62,1
S	11,08	-1,69	0,52	0,11	2,23	1,17636	0,93584	40,6
T	---	---	---	---	---	---	---	---
U	15	-0,59	-1,48	-0,35	-0,92	2,46788	0,52769	48,2

Ze: escore-Z.

Descrição das variáveis clínicas e laboratoriais de cada indivíduo no tempo 4 de coleta, Ribeirão Preto, 2021

Indivíduo	Idade (anos)	Estatura (Ze)	IMC (Ze)	IGF-1 (Ze)	IGFBP- 3 (Ze)	IGF1R (2^{-ΔΔCT})	RANKL (2^{-ΔΔCT})	Osteocalcina (ng/ml)
A	5,92	-6,83	-0,62	-1,64	-1,64	1,79524	0,79151	26,5
B	7,67	-4,92	-0,76	-1,47	0,6	1,79398	0,81037	30
C	8,08	-5,28	1,94	-0,9	0,06	1,20734	0,87438	36,1
D	9,42	-4,9	1,65	0,3	-1,08	1,36956	0,65757	45,1
E	4,83	-3	0,47	-1,79	-0,19	1,51695	0,93541	29,1
F	7,42	-2,53	1,02	-0,22	1,53	2,7719	0,52245	39,5
G	8,5	-1,82	0,32	-0,29	0,03	2,88562	0,72567	39,8
H	13	-5,14	-0,47	0,34	-0,37	1,61255	0,6017	59,6
I	13,75	-4,68	0,23	0,74	0,98	0,63084	0,63435	93,3
J	14,83	-2,2	0,62	0,67	0,96	1,57142	0,19952	126
K	---	---	---	---	---	---	---	---
L	12,83	-4,06	-0,39	-0,01	2,19	1,39958	0,47797	61,6
M	6,08	-0,51	1,79	0,85	2,38	1,76667	0,32254	36,9
N	6,5	-1,28	1,66	-0,87	0,82	1,58141	0,99049	32,3
O	6,75	-0,32	1,75	0,14	1,07	1,72141	0,57138	52,2
P	9,58	-2,24	-1,88	-1,15	-0,28	3,64071	0,1843	32,4
Q	9,67	-0,52	0,55	1,09	2,03	0,90447	0,76479	66,9
R	10,92	-1,53	3,07	0,7	1,75	2,90975	0,63338	40,4
S	11,42	-1,76	0,46	-0,99	1,92	0,91437	1,31116	53,5
T	---	---	---	---	---	---	---	---
U	15,33	-0,67	-1,76	-0,41	-0,42	2,23872	0,47276	37,9

Ze: escore-Z.

Descrição das variáveis clínicas e laboratoriais de cada indivíduo no tempo 5 de coleta, Ribeirão Preto, 2021

Indivíduo	Idade (anos)	Estatura (Ze)	IMC (Ze)	IGF-1 (Ze)	IGFBP- 3 (Ze)	IGF1R (2^{-ΔΔCT})	RANKL (2^{-ΔΔCT})	Osteocalcina (ng/ml)
A	6,33	-6,43	-0,58	-1,41	-1,16	2,45221	0,9788	32,1
B	8	-4,81	-0,55	-0,87	1,63	2,13428	1,39257	36,5
C	---	---	---	---	---	---	---	---
D	9,92	-4,35	1,31	-0,38	-1,2	1,685	1,28677	29,1
E	5,17	-2,94	0,39	-1,63	0,9	1,56993	2,35006	30,6
F	7,75	-2,58	1,23	-0,28	1,55	2,05134	0,81454	37,3
G	8,83	-1,86	0,41	0,52	0,87	2,50619	0,93109	40,4
H	13,33	-5,02	-0,28	1,64	-0,35	2,94821	0,39717	52,6
I	---	---	---	---	---	---	---	---
J	15,08	-2,25	-0,16	-1,53	-0,2	2,08684	0,51685	92,2
K	---	---	---	---	---	---	---	---
L	13,17	-3,94	-0,09	1,53	2,92	1,78105	0,52988	90,2
M	6,33	-0,45	1,92	-0,1	2,77	2,17008	0,59905	34,7
N	---	---	---	---	---	---	---	---
O	7,08	-0,29	1,36	0,35	1,36	1,02866	0,42876	48,2
P	9,92	-2,37	-1,99	-1,23	0,61	1,60026	0,745	41,6
Q	10	-0,64	0,43	0,2	1,24	1,34369	0,67278	88,4
R	11,17	-1,54	3,11	0,47	1,64	1,31155	0,56185	38,1
S	11,75	-1,82	0,66	-0,29	2,05	1,83762	1,70330	51,8
T	---	---	---	---	---	---	---	---
U	15,67	-0,76	-1,86	-1,1	-0,42	2,75139	0,87519	30

Ze: escore-Z.

APÊNDICE D- Comparação dos grupos com formas leves e formas moderadas e graves, com as variáveis descritas de acordo com a média, desvio padrão, valor mínimo, quartil inferior, mediana, quartil superior e valor máximo, Ribeirão Preto, 2021

Grupo	N Obs	Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Quartil inferior	Mediana	Quartil superior	Máximo
L	9	Idade	8.82	3.10	5.00	5.75	8.58	10.42	14.33
		Estatura (Ze)	-1.06	0.57	-1.98	-1.51	-0.95	-0.61	-0.34
		IMC (Ze)	0.24	1.69	-1.96	-1.39	0.43	0.72	3.32
		IGF-1 (Ze)	-0.71	0.66	-2.10	-1.04	-0.62	-0.21	-0.01
		IGFBP-3(Ze)	-0.62	1.13	-2.85	-1.22	-0.60	0.35	0.66
		<i>IGF1R</i>	1.71	0.57	1.07	1.21	1.40	2.22	2.56
		<i>RANKL</i>	0.73	0.16	0.55	0.64	0.72	0.86	1.03
		Osteocalcina	64.77	35.08	34.70	46.40	50.60	75.10	149.00
		Mg	2.26	0.25	1.81	2.14	2.32	2.41	2.60
		CaT	9.57	0.47	8.96	9.36	9.44	9.75	10.56
		Pi	4.58	0.40	4.22	4.31	4.45	4.55	5.32
		FA	643.58	159.09	517.11	544.75	590.60	601.70	971.13
		alb	4.51	0.14	4.30	4.46	4.55	4.60	4.68
		Cr	0.38	0.09	0.26	0.33	0.36	0.40	0.58
		Ur	26.00	7.89	18.75	22.49	24.00	25.92	45.42
		TGO	28.82	6.29	16.78	25.57	28.99	32.58	36.50
		TGP	23.13	16.95	11.10	18.28	18.83	19.90	67.29
		DXA	0,20	1,12	-1,60	-0,60	0,50	0,75	1,90
MG	12	Idade	8.90	3.83	3.25	6.42	7.46	12.17	14.75
		Estatura (Ze)	-3.94	1.53	-6.58	-5.03	-4.10	-2.68	-1.77
		IMC (Ze)	0.51	0.88	-0.98	-0.20	0.48	1.10	1.92
		IGF-1 (Ze)	-1.01	0.99	-2.42	-1.53	-1.07	-0.59	1.44
		IGFBP-3(Ze)	-0.78	0.79	-2.16	-1.15	-0.72	-0.35	0.40
		<i>IGF1R</i>	1.43	0.74	0.03	1.02	1.46	1.61	3.15
		<i>RANKL</i>	0.98	0.55	0.55	0.62	0.78	0.99	2.24
		Osteocalcina	46.63	12.46	28.50	35.90	46.30	54.35	72.70
		Mg	2.10	0.21	1.63	2.02	2.11	2.27	2.38
		CaT	9.88	0.36	9.35	9.64	9.79	10.21	10.43
		Pi	4.91	0.64	3.83	4.54	4.90	5.13	6.12
		FA	494.11	135.39	253.18	429.75	463.08	603.09	713.32
		alb	4.42	0.21	4.15	4.21	4.49	4.61	4.70
		Cr	0.39	0.15	0.20	0.29	0.37	0.49	0.66
		Ur	26.29	3.98	20.19	23.11	26.60	28.65	34.80
		TGO	34.53	14.08	19.00	25.14	28.36	44.94	60.29
		TGP	18.41	8.08	11.04	13.04	13.82	26.72	32.08
		DXA	-1,42	1,37	-3,00	-2,60	-2,00	-0,10	0,90

L: Forma Leve; M: Forma Moderada; G: Forma Grave; Ze: escore-Z; Ca: cálcio; Mg: magnésio; Pi: fósforo inorgânico; alb: albumina; FA: fosfatase alcalina; Ur: ureia; Cr: creatinina; TGO: transaminase glutâmico oxalacética; TGP: transaminase glutâmico pirúvica; DXA: densitometria óssea.

APÊNDICE E- Descrição da variação das médias das variáveis dos grupos A e B, entre os tempos 3 e 4 (D43) e tempos 3 e 5 (D53), de acordo com a média, desvio padrão, valor mínimo, quartil inferior, mediana, quartil superior e valor máximo

	Tempo	N Obs	Variável	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Quartil inferior	Mediana	Quartil superior	Máximo
A	D43	10	Estatura	8	0,03	0,20	-0,18	-0,12	-0,03	0,13	0,43
			IMC	8	-0,03	0,33	-0,35	-0,29	-0,17	0,22	0,58
			IGF-1	8	0,38	0,31	-0,06	0,10	0,42	0,60	0,83
			IGFBP-3	8	0,48	0,35	-0,23	0,36	0,53	0,69	0,87
			<i>IGF1R</i>	8	0,06	0,71	-0,91	-0,31	-0,21	0,66	1,13
			<i>RANKL</i>	8	-0,09	0,21	-0,46	-0,20	-0,06	0,01	0,21
			Osteocalcina	8	0,89	32,02	-47,70	-12,45	-1,75	8,30	66,60
	D53	10	Estatura	8	0,08	0,39	-0,17	-0,15	-0,05	0,13	0,98
			IMC	8	-0,17	0,51	-1,08	-0,47	-0,15	0,25	0,48
			IGF-1	8	0,01	1,20	-1,59	-0,64	-0,28	0,57	2,37
			IGFBP-3	8	0,60	0,57	-0,34	0,30	0,62	0,87	1,60
			<i>IGF1R</i>	8	-0,10	0,47	-0,91	-0,50	0,08	0,30	0,32
			<i>RANKL</i>	8	0,20	0,17	-0,20	0,19	0,24	0,31	0,36
			Osteocalcina	8	-2,65	27,89	-49,90	-13,45	-6,55	15,40	37,90
B	D43	11	Estatura	11	0,00	0,14	-0,17	-0,12	-0,04	0,08	0,31
			IMC	11	0,01	0,24	-0,61	-0,06	0,05	0,10	0,31
			IGF-1	11	-0,10	0,67	-1,10	-0,73	0,01	0,47	0,84
			IGFBP-3	11	0,07	0,53	-0,58	-0,28	-0,05	0,26	1,15
			<i>IGF1R</i>	11	0,16	0,70	-0,84	-0,26	0,10	0,47	1,51
			<i>RANKL</i>	11	0,07	0,26	-0,43	-0,13	0,12	0,30	0,38
			Osteocalcina	11	-4,45	15,31	-21,70	-16,70	-7,70	2,10	30,20
	D53	11	Estatura	8	0,07	0,16	-0,13	-0,03	0,03	0,17	0,36
			IMC	8	0,15	0,14	0,00	0,07	0,14	0,17	0,46
			IGF-1	8	0,01	0,72	-1,62	-0,13	0,23	0,42	0,63
			IGFBP-3	8	0,29	0,77	-0,84	-0,37	0,40	0,92	1,28
			<i>IGF1R</i>	8	0,59	0,70	-0,49	0,17	0,55	0,97	1,80
			<i>RANKL</i>	8	0,31	0,61	-0,50	-0,12	0,25	0,63	1,44
			Osteocalcina	8	-4,46	17,17	-40,90	-17,00	-2,10	2,80	11,20

A: Grupo A; B: Grupo B; D43: diferença tempo 4 e 3 (tempo 4- tempo 3); D53: diferença tempo 5 e 3 (tempo 5 - tempo 3); IMC: Índice de massa corpórea; *IGF1R*: Insulin-like growth fator 1 receptor; *RANKL*: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; IGF-1: Insulin-like growth fator 1; IGFBP-3: Growth hormone binding protein-3; Os valores da idade estão representados em anos; estatura, IMC, IGF-1 e IGFBP-3 em escore-Z; *RANKL* e *IGF1R* em ($2^{-\Delta\Delta CT}$) e Osteocalcina em ng/ml, Ribeirão Preto, 2021

APÊNDICE F - Distribuição dos parâmetros laboratoriais analisados por idade dos participantes do estudo nos 5 tempos independente da medicação administrada

Nos 5 tempos analisados dos 21 indivíduos participantes do estudo, tivemos um total de 92 amostras para dosagem de IGF-1, IGFBP-3 e osteocalcina, e 91 amostras para expressão gênica de RNAm de *IGF1R* e *RANKL*. Os resultados dessas amostras estão demonstrados nas figuras abaixo, em que cada indivíduo com uma cor diferente está representado por pontos correspondentes a cada tempo de coleta e uma reta de tendência.

Em relação às expressões gênicas de RNAm de *IGF1R* e *RANKL*, observa-se uma reta ascendente para *IGF1R* e descendente para *RANKL*. No entanto, essas linhas de tendência apresentavam fraca correlação com o aumento da idade (coeficiente de Bland-Altman), portanto não verificamos alteração da expressão gênica com o aumento da idade.

Quando correlacionamos as variáveis IGF-1 e IGFBP-3 com a evolução das idades desses indivíduos, observa-se um aumento moderado para os escore-Z de IGF-1 e IGFBP-3 no decorrer do tempo idade (coeficiente de Bland-Altman).

Na avaliação dos níveis de osteocalcina dos indivíduos no decorrer do tempo, encontramos uma tendência de fraca correlação com o aumento da idade (coeficiente de Bland-Altman) (figuras abaixo).

Quanto ao CTX, apesar de ter sido dosado nos tempos de estudo, exceto no segundo tempo, os resultados não foram analisados pelo coeficiente de Bland-Altman, uma vez que a maioria das amostras se encontrava abaixo dos níveis de detecção do método.

Distribuição da expressão gênica de *IGF1R* ($2^{-\Delta\Delta CT}$) das 91 amostras coletadas pela idade dos participantes do estudo.

Distribuição da expressão gênica de *RANKL* ($2^{-\Delta\Delta CT}$) das 91 amostras coletadas pela idade dos participantes do estudo.

Distribuição das dosagens de IGF-1 (escore-Z) das 92 amostras coletadas pela idade dos participantes do estudo.

Distribuição das dosagens de osteocalcina (ng/ml) das 92 amostras coletadas pela idade dos participantes do estudo.

Anexos

ANEXO A - Protocolo atual de pamidronato padronizado no HC-FMRP-USP

Idade, periodicidade e doses:

- Pacientes menores de 2 anos:

Internação a cada 2 meses.

Prescrever Pamidronato 0,75 mg/kg/dia por 2 dias.

- Pacientes entre 2 e 3 anos:

Internação a cada 3 meses.

Prescrever pamidronato 1,125 mg/kg/dia por 2 dias.

- Pacientes maiores que 3 anos:

Internação a cada 4 meses.

Prescrever pamidronato 1,5 mg/kg/dia por 2 dias.

Como prescrever:

Diluir 1 ampola para 10 mL de SF, pegar o volume correspondente à dose desejada, rediluir para 100 mL de SF e correr em 3 horas (há ampolas de 15, 30, 60 e 90 mg).

Para todos os pacientes:

Dieta rica em cálcio. Prescrever o dobro da dose de carbonato de cálcio que usa em casa e manter por 1 semana após a alta. Prescrever vitamina D3, 1 gota (5000 UI), exceto se já tiver tomado nos últimos 3 dias. Orientar banho de sol diário e dieta rica em cálcio.

Solicitar pré-dose de pamidronato:

HMG, Ur, Cr, Ca total, Ca iônico, Mg iônico, Pi, FA, TGO, TGP, GAMA GT, Albumina. PTH a cada seis meses (checar quando foi o último). Solicitar o arquivo de RX e checar acompanhamento na ortopedia e fisioterapia.

ANEXO B - Protocolo proposto de ácido zoledrônico

Protocolo proposto: Tratamento com ácido zoledrônico (tradução e adaptação do grupo do *Shriners Hospital for Children*, Montreal - Quebec - Canadá):

O ácido zoledrônico é um fármaco bisfosfonato mais recente que tem efeitos semelhantes ao pamidronato no tratamento de crianças e adolescentes com OI. No protocolo original, o ciclo de tratamento consiste numa única infusão de 50 minutos e que os ciclos de tratamento são repetidos apenas de seis em seis meses. Traz uma vantagem posológica sobre o pamidronato.

Fizemos uma adaptação desse protocolo, mantendo a dose anual de 0,1 mg/kg fracionada em três vezes (a cada quatro meses):

Dosagem de Zoledronato: (Dose máxima anual: 5 mg).

Frequência de dosagem de idade:

- <2,0 anos para agora dados somente em estudos

- > 2,0 anos 0,033 mg por kg de peso corporal, infusão única, a cada 4 meses

Este esquema corresponde a uma dose anual de 0,1 mg por kg de peso corporal.

Ampola = 4 mg – diluir nem 5 ml de AD

Diluição:

Dose do ácido Zoledrônico	Quantidade de soro fisiológico	taxa de infusão (ml/h)
0 a 0,05 mg	10 ml	12,5
0,051 a 0,125 mg	10 ml	15
0,126 a 0,25 mg	15 ml	25
0,251 a 0,375 mg	20 ml	30
0,376 a 0,5 mg	30 ml	40
Acima de 0,5 mg	50 ml	65
Acima de 1 mg	100 ml	130

NOTA 1: A concentração máxima nunca deve exceder 0,022 mg/ml

NOTA 2: No *Shriners Hospital for Children*, Montreal - Quebec - Canadá, os pacientes que nunca foram expostos a bisfosfonatos antes e que recebem sua primeira infusão de ácido zoledrônico, são internados, uma vez que pode ocorrer uma reação de fase aguda. Ficam 48 h após a infusão. Os pacientes que receberam bisfosfonatos antes não precisam ficar internados.

Acompanhamento - Em cada ciclo de tratamento:

Avaliação clínica, avaliar:

- Antropometria: altura, peso
- Ingestão de cálcio e vitamina D (prescrever suplementos se as necessidades básicas não forem cobertas)

Avaliação laboratorial:

- Cálcio sérico ionizado antes da infusão (não administrar ácido zoledrônico se hipocalcemia)
- Teste de gravidez antes da infusão em todas as mulheres com potencial de engravidar. Se positivo, reter o tratamento.

Notas:

Observações:

- Não existem interações conhecidas de ácido zoledrônico com outras drogas.
- Tratamento com ácido zoledrônico e Procedimentos de Rondagem Intramedulares:

A cicatrização tardia da osteotomia foi significativamente maior em pacientes com OI que estão recebendo pamidronato do que naqueles que nunca receberam pamidronato (J Bone Miner Res 2004; 19: 1779- 1786). Efeitos semelhantes são prováveis para o ácido zoledrônico. Portanto, é recomendado não administrar ácido zoledrônico ou pamidronato nos quatro meses após uma intervenção ortopédica que envolve osteotomia.

ANEXO C – Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE IGF1R EM PACIENTES COM OSTEOGÊNESE IMPERFEITA EM USO DE BISFOSFONATOS E EM INDIVÍDUOS HÍGIDOS NOS DIFERENTES ESTÁGIOS PUBERAIS.

Pesquisador: Guilherme Manso de Lima

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 60483616.2.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.136.958

Continuação do Parecer: 4.136.658

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_129130_6_E1.pdf	29/06/2020 14:15:43		Aceito
Outros	CARTA_AO_CEP.docx	22/06/2020 13:25:39	Guilherme Manso de Lima	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Versao_3_projeto_de_pesquisa_completo.docx	22/06/2020 13:17:26	Guilherme Manso de Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO_VERSAO3.docx	22/06/2020 13:16:40	Guilherme Manso de Lima	Aceito
Outros	RESPOSTA_AO_PARECER_CONSUBSTANCIADO_DO_CEP.docx	11/12/2016 18:30:57	Guilherme Manso de Lima	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Versao_2_projeto_de_pesquisa_completo.docx	11/12/2016 18:29:16	Guilherme Manso de Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Versao_2_TCLE_VL.doc	11/12/2016 18:13:09	Guilherme Manso de Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Versao_2_TERMO_DE_ASSENTIMENTO_OI.docx	11/12/2016 18:00:19	Guilherme Manso de Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Versao_2_TERMO_DE_ASSENTIMENTO_Via_Lobato.docx	11/12/2016 17:56:22	Guilherme Manso de Lima	Aceito
Outros	carta_de_Anuencia_Ambulatorio.pdf	29/09/2016 10:27:41	Guilherme Manso de Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO_Via_Lobato.docx	29/09/2016 10:22:29	Guilherme Manso de Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO_OI.docx	29/09/2016 10:22:08	Guilherme Manso de Lima	Aceito
Outros	Aprovacao_Comite_Revisao_Cientifica_Pediatria_Folha5.pdf	15/09/2016 18:29:33	Guilherme Manso de Lima	Aceito
Outros	Aprovacao_Comite_Revisao_Cientifica_Pediatria_Folha4.pdf	15/09/2016 18:28:31	Guilherme Manso de Lima	Aceito
Outros	Aprovacao_Comite_Revisao_Cientifica_Pediatria_Folha3.pdf	15/09/2016 18:26:38	Guilherme Manso de Lima	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-000

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3032-2228

Fax: (16)3533-1144

E-mail: cep@hop.usp.br

**USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -**

Continuação do Parecer: 4.135.002

Outros	Aprovacao_Comite_Revisao_Cientifica_Pediatrica_Folha2.pdf	15/09/2016 18:24:17	Guilherme Manso de Lima	Acerto
Outros	Aprovacao_Comite_Revisao_Cientifica_Pediatrica_Folha1.pdf	15/09/2016 18:21:56	Guilherme Manso de Lima	Acerto
Outros	Carta_de_anuencia_Vila_Lobato.pdf	15/09/2016 18:17:41	Guilherme Manso de Lima	Acerto
Outros	Carta_de_anuencia_Laboratorio.pdf	15/09/2016 18:16:18	Guilherme Manso de Lima	Acerto
Outros	Carta_de_anuencia_enfermaria.pdf	15/09/2016 18:06:56	Guilherme Manso de Lima	Acerto
Outros	UPC.pdf	15/09/2016 18:03:40	Guilherme Manso de Lima	Acerto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_de_pesquisa_completo.docx	15/09/2016 18:02:26	Guilherme Manso de Lima	Acerto
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_Vila_Lobato.docx	15/09/2016 17:57:34	Guilherme Manso de Lima	Acerto
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_Oi.docx	15/09/2016 17:56:21	Guilherme Manso de Lima	Acerto
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	15/09/2016 17:54:57	Guilherme Manso de Lima	Acerto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 06 de Julho de 2020

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-000
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3032-2228 Fax: (16)3033-1144 E-mail: cep@hop.usp.br