Manuela Giuliani Marcondes Rocha Braz

**Sequenciamento paralelo em larga escala de
genes candidatos para fragilidade óssea em indivíduos com
osteoporose grave, familiar ou idiopática**

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Dr. Bruno Ferraz de Souza

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Braz, Manuela Giuliani Marcondes Rocha
Sequenciamento paralelo em larga escala de genes
candidatos para fragilidade óssea em indivíduos com
osteoporose grave, familiar ou idiopática / Manuela
Giuliani Marcondes Rocha Braz. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientador: Bruno Ferraz de Souza.

Descritores: 1.Osteoporose 2.Genética
3.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala
4.Fraturas por osteoporose 5.Osteoporose idiopática
6.Osteoporose familiar

USP/FM/DBD-154/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Este trabalho foi realizado na Unidade de Doenças Osteometabólicas da Divisão de Endocrinologia, no Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio LIM-18 e no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular LIM-25 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio da CAPES, bolsa de doutorado direto – Demanda Social, subsidiado com o auxílio à pesquisa FAPESP (Multiusuário 2013/02162-8).

Dedicatória

Dedico esta tese à minha
prima Júlia, que me mostrou
de diferentes formas a
intensidade dessa vida.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, eu agradeço ao meu orientador, Bruno Ferraz de Souza, por ter confiado em mim a execução deste trabalho. Com todo o seu conhecimento, didática e paciência, pude aprender muito nestes anos de doutorado. Agradeço também o seu apoio durante momentos mais difíceis.

À Berenice Bilharinho de Mendonça, pela inclusão deste trabalho em um projeto multitemático, permitindo sua viabilidade financeira. Além disso, junto à Ana Claudia Latrônico, agradeço pelo estímulo à pesquisa na divisão de Endocrinologia, criando um ambiente de excelência acadêmica.

Agradeço ao SELA, onde foi realizado o sequenciamento de larga escala, etapa fundamental deste projeto, e à Mônica Malheiros França, responsável pela execução dos sequenciamentos deste trabalho.

Sou grata aos colegas que contribuíram encaminhando pacientes, o que enriqueceu a casuística deste trabalho: Ana Claudia Latronico, Berenice Bilharinho Mendonça, Cynthia Brandão, Cristiano Campagnolo, Flávia Siqueira Cunha, Lenira Stella, Lilian Araujo Caetano, Luciani de Carvalho, Maíra Rovigatti Franco, Marcello Delano Bronstein, Marcelo Pinheiro, Maria Candida Fragoso, Marina da Cunha Silva, Monique Ohe, Paula Waki Rosa, Regina Matsunaga Martin e Rosa Maria Pereira. Agradeço ao Adriano Namó Cury, que me abriu as portas da Santa Casa, onde tive acesso a um ambulatório rico de pacientes que contribuiu para essa casuística.

Agradeço aos pacientes e seus familiares, que consentiram em participar desta pesquisa e dispuseram de seu tempo.

À Enfermagem do ambulatório de Endocrinologia, que gentilmente realizou todas as coletas de sangue deste trabalho.

A toda a equipe do LIM-18 e LIM-25, pela convivência durante os anos deste trabalho e, em especial, ao Rodolfo Batista e à Marcia Correia, que realizaram a extração das amostras de DNA, e à Aritania Santos e à Ana Mercedes Cavaleiro pela ajuda durante os experimentos realizados no laboratório.

Agradeço ao Antonio Marcondes Lerario pela análise bioinformática, ao Alexander Augusto de Lima Jorge pelos conselhos sobre a interpretação desta análise e ao Lucas Santana pela ajuda com a revisão bioinformática.

Aos que compuseram minha banca de qualificação, Marcelo de Medeiros Pinheiro, Milena Gurgel Teles e Alexander Augusto de Lima Jorge, pelo tempo que dispuseram e pelas considerações que contribuíram significativamente para o desenvolvimento deste trabalho e elaboração da tese.

À Leslie Kulikowski e à Evelin Zanardo pela colaboração nos estudos de citogenômica.

À Adriana Fernandes e Vivian Simões, pelo convívio e ajuda durante o atendimento dos pacientes no ambulatório.

Aos colegas e amigos da Endocrinologia da Santa Casa. À Nilza Maria Scalissi pela ajuda e companhia durante o ambulatório, e principalmente pela compreensão durante os meses de conclusão deste trabalho. Aos outros assistentes pelo apoio constante. E aos residentes atuais e passados, pela convivência alegre e por exigirem que eu me mantenha atualizada para poder ensinar e aprender com eles.

Ao Ivo Jorge Prado Arnhold por me iniciar no mundo científico da Endocrinologia, me orientando desde o terceiro ano da faculdade.

Ao Pedro Henrique Silveira Corrêa, que, juntamente com a Regina Matsunaga Martin, me apresentaram ao metabolismo ósseo. Agradeço também aos professores que tive na Endocrinologia, com quem aprendi muito e que são fontes constantes de inspiração.

Aos amigos endocrinologistas, por tornarem essa jornada mais agradável e divertida. E a todos os amigos que me incentivaram e se mantiveram presentes.

Eu agradeço aos meus pais, por sempre estimularem minha curiosidade e por terem me proporcionado incontáveis oportunidades de aprendizado ao longo da vida. Aos meus avós e familiares, que sempre participaram e comemoraram minha evolução nos estudos. Aos meus irmãos, por estarem sempre ao meu lado. Aos meus sobrinhos e afilhados, pela alegria que proporcionam.

Por fim, agradeço ao meu marido, que acompanhou de perto o longo processo deste Doutorado e me apoiou incondicionalmente.

“Tantos seguiram esse caminho,
Tantos o seguirão ainda,
Todos à procura do mesmo ponto,
Sempre distante, fugidio,
Cavalgando a fimbria do horizonte.”

Luiz Marcondes Rocha

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.
- Abreviaturas dos genes de acordo com *HUGO Gene Nomenclature Committee*

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos de genes

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1. Patogênese da osteoporose e vias de sinalização do metabolismo ósseo	2
1.2. Herdabilidade e genética da osteoporose	8
1.3. Busca de genes candidatos para osteoporose	13
Justificativa	16
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Métodos	19
3.1 Casuística	19
3.1.1. Diagnóstico clínico.....	19
3.2. Obtenção de amostras de DNA.....	22
3.3. Análise molecular	23
3.3.1. Seleção de genes candidatos	23
3.3.2. Sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE)	24
3.3.3. Sequenciamento confirmatório pelo método de Sanger	28
3.3.4. Análise de variantes de número de cópia	29
3.3.5. Análise de segregação familiar	30
4. Resultados.....	31
4.1. Seleção de genes candidatos	31
4.1.1. Genes candidatos selecionados a partir de doenças Mendelianas	33
4.1.2. Genes candidatos selecionados a partir de fenótipos extremos de osteoporose	36
4.1.3. Genes candidatos selecionados a partir de estudos de ligação em escala genômica (GWAS)	38
4.2. Pacientes selecionados para o estudo.....	44
4.3. Sequenciamento genético.....	50
4.3.1. Análise de variantes de ponto e pequenas indels	52
4.3.2. Análise de variantes de número de cópias	52
4.3.3. Características das variantes de interesse identificadas pelo SPLE	54

5. Discussão	62
5.1. Contextualização dos achados moleculares	70
Implicações	78
6. Conclusões	78
7. Referências	80
Apêndice	93

Lista de figuras

Figura 1 – Fatores envolvidos na via de sinalização RANK-RANKL-OPG.	4
Figura 2 – Fatores envolvidos na via de sinalização Wnt.	5
Figura 3 – Fatores envolvidos na via de sinalização Notch.	7
Figura 4 – Espectro fenotípico da variabilidade genética em LRP5 e SOST.....	11
Figura 5 – Relação entre frequência e impacto fenotípico de variantes genéticas.	12
Figura 6 – Características clínicas da coorte	45
Figura 7 – Heredogramas das famílias incluídas no projeto.	49
Figura 8 – Análise por array citogenômico para confirmação das variantes de número de cópias.	53

Lista de tabelas

Tabela 1 – 128 genes incluídos no painel de SPLE, de acordo com o motivo de inclusão	32
Tabela 2 – Genes associados a doenças Mendelianas com alteração de resistência óssea	34
Tabela 3 – Genes incluídos no painel por sua associação a formas extremas de osteoporose	37
Tabela 4 – Genes incluídos no painel de sequenciamento a partir de GWAS	39
Tabela 5 – Características clínicas dos pacientes submetidos ao sequenciamento paralelo em larga escala.....	46
Tabela 6 – Dados de cobertura do sequenciamento paralelo em larga escala	51
Tabela 7 – Variantes de interesse identificadas por SPLE e confirmadas por Sanger ou <i>array</i> citogenômico.....	55
Tabela 8 – Coordenadas genômicas e identificação dos transcritos referentes às variantes identificadas	57
Tabela 9 – Resultados da análise de segregação familiar	59
Tabela 10 – VPPs previamente descritas.....	61
Tabela 11 – Resumo dos estudos previamente publicados sobre variantes genéticas em casos extremos de OP	65

Lista de abreviaturas

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i> ; Colégio Americano de Genética e Genômica Médica
AD	Autossômica dominante
AMP	<i>Association for Molecular Pathology</i> ; Associação para Patologia Molecular
AR	Autossômica recessiva
BMOI	Baixa massa óssea para idade
CADD	<i>Combined Annotation-Dependent Depletion</i>
CNV	<i>Copy number variant</i> , variante de número de cópia
CONTRA	<i>Copy Number Analysis for Targeted Resequencing</i>
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>
DMO	Densidade mineral óssea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOM	Doenças osteometabólicas
DXA	<i>Double X-ray absorptiometry</i> ; absorciometria por dupla fonte de raio-X; Densitometria óssea
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i> ; estudos de associação em escala genômica
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HGMD	<i>Human gene mutation database</i>
HSCM-SP	Hospital Santa Casa de Misericórdia de São Paulo
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
LIM	Laboratório de investigação médica
LOVD	<i>Leiden Open (source) Variation Database</i>
MAF	<i>Minor allele frequency</i> ; frequência do alelo menos comum
MGI	<i>Mouse Genome Informatics</i>
ND	Não determinado
NICD	<i>Nuclear intracellular Notch domain</i> ; domínio nuclear intracelular de Notch
NFκB	<i>Nuclear factor KappaB</i> ; fator nuclear KappaB
Ob	Osteoblasto
Oc	Osteoclasto
OI	Osteogênese imperfeita
OIJ	Osteoporose idiopática juvenil
OIVD	<i>Osteogenesis imperfecta variation database</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OP	Osteoporose
pb	Pares de base
PolyPhen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
PTH	Paratormônio
PTH-rp	<i>PTH-related protein</i> ; proteína relacionada ao PTH

RNA	Ácido ribonucleico
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> ; polimorfismo de nucleotídeo único
SPLE	Sequenciamento paralelo em larga escala
TSH	<i>Thyroid stimulating hormone</i> ; hormônio estimulador da tireoide

Lista de símbolos de genes

<i>ABCC8</i>	ATP binding cassette subfamily C member 8
<i>ABCF2</i>	ATP binding cassette subfamily F member 2
<i>ABL1</i>	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
<i>ADAMTS18</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 18
<i>ALDH7A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 7 family member A1
<i>ANAPC1</i>	Anaphase promoting complex subunit 1
<i>ANOS1 (KAL1)</i>	Anosmin 1
<i>ARHGAP1</i>	Rho GTPase activating protein 1
<i>AXIN1</i>	Axin 1
<i>BMP1</i>	Bone morphogenetic protein 1
<i>C17orf53</i>	Chromosome 17 open reading frame 53
<i>C7orf76</i>	Chromosome 7 open reading frame 76
<i>CA2</i>	Carbonic anhydrase 2
<i>CCDC170</i>	Coiled-coil domain containing 170
<i>CDC5L</i>	Cell division cycle 5 like
<i>CKAP5</i>	Cytoskeleton associated protein 5
<i>CLCN7</i>	Chloride voltage-gated channel 7
<i>CLDN14</i>	Claudin 14
<i>COL1A1</i>	Collagen type I alpha 1
<i>COL1A2</i>	Collagen type I alpha 2
<i>COLEC10</i>	Collectin subfamily member 10
<i>CPED1</i>	Cadherin like and PC-esterase domain containing 1
<i>CPN1</i>	Carboxypeptidase N subunit 1
<i>CREB3L1</i>	cAMP responsive element binding protein 3-like 1
<i>CRHR1</i>	Corticotropin releasing hormone receptor 1
<i>CRTAP</i>	Cartilage associated protein
<i>CTNNB1</i>	Catenin beta 1
<i>CTSK</i>	Cathepsin K
<i>CYLD</i>	CYLD lysine 63 deubiquitinase
<i>DCDC1</i>	Doublecortin domain containing 1
<i>DCDC5</i>	Doublecortin domain containing 5
<i>DHH</i>	Desert hedgehog
<i>DKK1</i>	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
<i>DLX5</i>	Distal-less homeobox 5
<i>DLX6</i>	Distal-less homeobox 6
<i>DMP1</i>	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
<i>DNM3</i>	Dynamin 3
<i>DSPP</i>	Dentin sialophosphoprotein
<i>ERC1</i>	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1
<i>ESR1</i>	Estrogen receptor 1
<i>F2</i>	Coagulation factor II, thrombin
<i>FAM210A</i>	Family with sequence similarity 210 member A
<i>FAM3C</i>	Family with sequence similarity 3 member C

<i>FAM9A</i>	Family with sequence similarity 9 member A
<i>FAM9B</i>	Family with sequence similarity 9 member B
<i>FBN1</i>	Fibrillin 1
<i>FKBP10</i>	FK506 binding protein 10
<i>FKBP11</i>	FK506 binding protein 11
<i>FOXC2</i>	Forkhead box C2
<i>FOXL1</i>	Forkhead box L1
<i>FTO</i>	Fat mass and obesity associated
<i>FUBP3</i>	Far upstream element binding protein 3
<i>GALNT3</i>	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3
<i>GLP1R</i>	Glucagon like peptide 1 receptor
<i>GPATCH1</i>	G-patch domain containing 1
<i>GPR68</i>	G protein-coupled receptor 68
<i>HDAC5</i>	Histone deacetylase 5
<i>IBSP</i>	Integrin binding sialoprotein
<i>IDUA</i>	Iduronidase, alpha-L-
<i>IFITM5</i>	Interferon induced transmembrane protein 5
<i>INSIG2</i>	Insulin induced gene 2
<i>IRX3</i>	Iroquois homeobox 3
<i>IRX5</i>	Iroquois homeobox 5
<i>JAG1</i>	Jagged 1
<i>KCNJ11</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily J member 11
<i>KCNMA1</i>	Potassium calcium-activated channel subfamily M alpha 1
<i>LACTB2</i>	Lactamase beta 2
<i>LEKR1</i>	Leucine, glutamate and lysine rich 1
<i>LGR4</i>	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4
<i>LIN7C</i>	Lin-7 homolog C, crumbs cell polarity complex component
<i>LRP4</i>	LDL receptor related protein 4
<i>LRP5</i>	LDL receptor related protein 5
<i>LRP6</i>	LDL receptor related protein 6
<i>MARK3</i>	Microtubule affinity regulating kinase 3
<i>MEF2C</i>	Myocyte enhancer factor 2C
<i>MEPE</i>	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
<i>MPP7</i>	Membrane palmitoylated protein 7
<i>MTHFR</i>	Methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)
<i>NBR1</i>	Neighbor of BRCA1 gene 1
<i>NOTCH2</i>	Notch 2
<i>NTAN1</i>	N-terminal asparagine amidase
<i>OSTM1</i>	Osteopetrosis associated transmembrane protein 1
<i>P3H1</i>	Prolyl 3-hydroxylase 1
<i>P4HB</i>	Prolyl 4-hydroxylase subunit beta
<i>PDXDC1</i>	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1
<i>PKDCC</i>	Protein kinase domain containing, cytoplasmic
<i>PLEKHM1</i>	Pleckstrin homology and RUN domain containing M1
<i>PLOD2</i>	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
<i>PLOD3</i>	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
<i>PLS3</i>	Plastin 3

<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
<i>PIIB</i>	Peptidylprolyl isomerase B
<i>PTDSS1</i>	Phosphatidylserine synthase 1
<i>PTDSS2</i>	Phosphatidylserine synthase 2
<i>PTH1R</i>	Parathyroid hormone 1 receptor
<i>PTH1H</i>	Parathyroid hormone-like hormone
<i>RPS6KA5</i>	Ribosomal protein S6 kinase A5
<i>RSPO3</i>	R-spondin 3
<i>RUNX2</i>	Runt related transcription factor 2
<i>SALL1</i>	Spalt-like transcription factor 1
<i>SEC24D</i>	SEC24 homolog D, COPII coat complex component
<i>SERPINF1</i>	Serpin family F member 1
<i>SERPINH1</i>	Serpin family H member 1
<i>SHFM1</i>	Split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1
<i>SLC29A3</i>	Solute carrier family 29 member 3
<i>SLC34A1</i>	Solute carrier family 34 member 1
<i>SLC9A3R1</i>	SLC9A3 regulator 1
<i>SMG6</i>	SMG6, nonsense mediated mRNA decay factor
<i>SMOC1</i>	SPARC related modular calcium binding 1
<i>SNX10</i>	Sorting nexin 10
<i>SOST</i>	Sclerostin
<i>SOX4</i>	SRY-box 4
<i>SOX6</i>	SRY-box 6
<i>SOX9</i>	SRY-box 9
<i>SP7</i>	Sp7 transcription factor
<i>SPP1</i>	Secreted phosphoprotein 1
<i>SPTBN1</i>	Spectrin beta, non-erythrocytic 1
<i>STARD3NL</i>	STARD3 N-terminal like
<i>SUCO</i>	SUN domain containing ossification factor
<i>SUPT3H</i>	SPT3 homolog, SAGA and STAGA complex component
<i>TCIRG1</i>	T-cell immune regulator 1, ATPase H ⁺ transporting V0 subunit a3
<i>TMEM263</i>	Transmembrane protein 263
<i>TMEM38B</i>	Transmembrane protein 38B
<i>TNFRSF11A</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11a (RANK)
<i>TNFRSF11B</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b (osteoprotegerin)
<i>TNFSF11</i>	Tumor necrosis factor superfamily member 11 (RANKL)
<i>TTC21B</i>	Tetratricopeptide repeat domain 21B
<i>USF3</i>	Upstream transcription factor family member 3
<i>WLS</i>	Wntless Wnt ligand secretion mediator
<i>WNT1</i>	Wnt family member 1
<i>WNT16</i>	Wnt family member 16
<i>WNT3A</i>	Wnt family member 3A
<i>WNT5B</i>	Wnt family member 5B
<i>XKR9</i>	XK related 9
<i>ZBTB40</i>	Zinc finger and BTB domain containing 40
<i>ZNF408</i>	Zinc finger protein 408

Resumo

Braz MGMR. *Sequenciamento paralelo em larga escala de genes candidatos para fragilidade óssea em indivíduos com osteoporose grave, familiar ou idiopática* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A osteoporose é uma doença de alta prevalência na população geral, e a ocorrência de fraturas se associa a grande morbi-mortalidade e impacto econômico. Na maioria dos indivíduos afetados, a osteoporose tem etiologia multifatorial, com herdabilidade estimada entre 50 e 85%, atribuível a um conjunto de variantes genéticas de pequeno efeito individual. Raramente, há casos de osteoporose associada a síndromes monogênicas, decorrentes de defeitos genéticos de grande impacto. Postula-se que indivíduos com quadros extremos de osteoporose não sindrômica possam ter causa genética mono- ou oligogênica, atribuível a variantes de impacto intermediário sobre o fenótipo, ainda pouco reconhecidas. Nos últimos anos, o avanço das tecnologias de sequenciamento permitiu o reconhecimento de novos genes associados à fragilidade óssea e atualmente possibilita a análise simultânea de múltiplos genes. Neste contexto, os objetivos deste projeto de pesquisa foram: 1) buscar genes candidatos para fragilidade óssea previamente associados a doenças Mendelianas com alto impacto na resistência óssea, fenótipos extremos de osteoporose e estudos de associação genética em escala genômica (GWAS) para osteoporose; e 2) pesquisar a presença de variantes alélicas patogênicas nestes genes candidatos em indivíduos com osteoporose grave, familiar ou idiopática. A partir de revisão sistemática, 128 genes candidatos foram selecionados para compor um painel de sequenciamento paralelo em larga escala. O sequenciamento incluiu todos os éxons e 25 pares de bases das junções íntron-éxon. Foram consideradas variantes genéticas de interesse aquelas raras (frequência alélica

< 1%) e com predição de alto impacto sobre a proteína codificada. Trinta e sete indivíduos (7 famílias e 21 casos isolados) foram selecionados seguindo critérios clínicos, laboratoriais e densitométricos restritivos, excluindo-se pacientes com causas secundárias de osteoporose. A coorte foi composta por homens em 54%, a mediana de idade ao diagnóstico foi 44 anos e 86% tinham histórico de fratura. Dentre os 28 casos índices, foram identificadas 33 variantes de interesse. Após análise de segregação familiar, foi possível excluir patogenicidade de cinco destas variantes, restando 28 variantes potencialmente patogênicas, presentes em 71% da coorte. Todas as variantes foram encontradas em heterozigose, sendo 26 variantes de ponto não-sinônimas, uma deleção de 9 pares de bases, e uma grande deleção envolvendo o único éxon codificador do gene candidato *GPR68*. Foi encontrada uma associação de variantes em genes diferentes em 21% da coorte, incluindo uma mulher jovem com osteoporose grave e variantes em *WNT1*, *PLS3* e *NOTCH2*. A análise de segregação familiar neste caso sugeriu um efeito patogênico aditivo das variantes. Vinte e cinco por cento das variantes potencialmente patogênicas foram identificadas em genes candidatos bem estabelecidos (*WNT1*, *PLS3*, *COL1A1*, *COL1A2*), e 57% se localizam em novos genes candidatos identificados inicialmente por GWAS, como *NBR1* e *GPR68*, também associados à alteração da remodelação óssea em modelos animais. Os resultados deste trabalho dão relevância a novos genes na fisiologia da resistência óssea e indicam um papel proeminente de interações digênicas/oligogênicas em casos de osteoporose grave, familiar ou idiopática. O reconhecimento de novas vias associadas à fragilidade óssea pode levar ao desenvolvimento de novos tratamentos, e a identificação de variantes patogênicas associadas à osteoporose pode, futuramente, permitir um manejo clínico personalizado de pacientes e seus familiares.

Descritores: osteoporose; genética; sequenciamento de nucleotídeos em larga escala; fraturas por osteoporose; osteoporose idiopática; osteoporose familiar.

Abstract

Braz MGR. *Massively parallel sequencing of candidate genes for bone fragility in subjects with severe, familial or idiopathic osteoporosis* [thesis]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Osteoporosis is a highly prevalent disorder resulting in fragility fractures and incurring in great morbi-mortality and economic burden. In most cases, osteoporosis has a multifactorial etiology, with an estimated heritability of 50-85% attributable to a combination of several low-impact genetic variants. Rarely, cases of syndromic osteoporosis due to high-impact genetic defects are seen. It is therefore hypothesized that severe/idiopathic cases of otherwise inconspicuous osteoporosis may have a mono- or oligogenic etiology due to genetic variants with an intermediate effect. During the past years, advances in molecular sequencing have revealed novel candidate genes for bone fragility, and have enabled simultaneous sequencing of multiple genes. In this context, the objectives of this research project were: 1) to identify candidate genes for bone fragility, as previously reported in association to Mendelian disorders with high impact on bone resistance, idiopathic or familial osteoporosis, and genome-wide association studies (GWAS) for bone mineral density and fragility fractures; and 2) to perform molecular analysis of these candidate genes in patients with severe, familial or idiopathic osteoporosis. Through a systematic review, 128 candidate genes were identified and included in a panel for massively parallel sequencing. Coding regions and 25-bp boundaries were captured and sequenced. Rare variants (allele frequency < 1%), with a predicted high impact on protein function were initially selected as variants of interest. Thirty-seven subjects (21 sporadic cases and 7 families) were included according to stringent criteria based on clinical and densitometric evaluation, excluding

individuals with secondary osteoporosis. Males represented 54% of the cohort, median age at diagnosis was 44 years, and 84% of subjects had a history of fractures. Thirty-three variants of interest were identified initially. After familial segregation analysis, 5 variants were considered as benign in regard to bone fragility, resulting in 28 potentially pathogenic variants, all heterozygous, present in 71% of the cohort. Of these variants, 26 were nonsynonymous, there was one 9-bp deletion and one large deletion involving the only coding exon of candidate gene *GPR68*. An association of two or more variants in different genes was present in 21% of the cohort, including a young woman with severe osteoporosis and variants in *WNT1*, *PLS3* and *NOTCH2*. Familial segregation in this case suggested an additive pathogenic effect of these variants. Twenty-five percent of potentially pathogenic variants were identified in well-established candidate genes (*WNT1*, *PLS3*, *COL1A1*, *COL1A2*), and 57% located to novel candidate genes initially identified by GWAS, such as *NBR1* and *GPR68*, which have been previously associated to changes in bone remodeling in mouse models. These results support the involvement of GWAS genes in the pathophysiology of osteoporosis, and indicate a prominent role for digenic/oligogenic interactions in cases of severe, familial or idiopathic osteoporosis. Recognition of new molecular pathways in the determination of bone fragility may lead to the development of new drugs, and the identification of pathogenic variants associated to osteoporosis may allow individualized clinical management of patients and their relatives.

Descriptors: osteoporosis; genetics; high-throughput nucleotide sequencing; osteoporotic fractures; idiopathic osteoporosis; familial osteoporosis.

1. Introdução

Osteoporose (OP) é uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, determinando fragilidade óssea (1). Como consequência, há maior risco de ocorrência de fraturas de fragilidade, definidas como aquelas desproporcionais ao trauma que as gerou, por exemplo, as decorrentes de quedas da própria altura. Os sítios mais frequentemente acometidos por fraturas de fragilidade são vértebras, antebraço e quadril (2).

A incidência da osteoporose aumenta com a idade e é maior no sexo feminino. No Brasil, estima-se a prevalência de osteoporose, em indivíduos acima de 40 anos, em torno de 12,8% em homens e 15,1% em mulheres (3). O diagnóstico, conforme estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1994, é feito com base na densidade mineral óssea (DMO), medida pela densitometria óssea (absorciometria por dupla fonte de raio-X; DXA) (4). Concordante com este posicionamento, atualmente se define osteoporose em mulheres após a menopausa ou homens acima de 50 anos com T-score abaixo de ou igual a -2,5 em um dos seguintes sítios: coluna lombar, colo de fêmur ou fêmur total (5). Estudos observacionais demonstram que a DMO isoladamente não é capaz de prever todos os pacientes em risco de fraturas de fragilidade (6). Por este motivo, alguns autores têm sugerido definir osteoporose também a partir da presença de uma ou mais fraturas de fragilidade (7).

Dados epidemiológicos do Reino Unido mostram que metade das mulheres e um quinto dos homens acima de 50 anos apresentam fratura de fragilidade ao longo da vida (8). Entre 2008 e 2010, o SUS gastou acima de R\$ 288 milhões com procedimentos

relacionados ao tratamento de osteoporose em idosos, incluindo tratamento medicamentoso e de fraturas, demonstrando o impacto econômico da doença (9). Há também grande morbidade e mortalidade associadas à ocorrência de fraturas de fragilidade. Nos Estados Unidos, após uma fratura, 7% dos pacientes apresentam algum grau de incapacidade permanente e 8% requerem assistência domiciliar (10). Após a ocorrência de fratura de quadril ou vértebra, há redução de 20% da sobrevida em cinco anos (11).

Estes dados denotam a relevância da osteoporose, atribuída à sua alta prevalência, impacto negativo sobre qualidade e tempo de vida, e grande repercussão econômica em termos de política de saúde.

1.1. Patogênese da osteoporose e vias de sinalização do metabolismo ósseo

Ao longo da vida, o esqueleto humano passa constantemente pelo processo de remodelação óssea, envolvendo reabsorção e formação de tecido ósseo executadas por 3 células principais: osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Os osteoclastos, derivados de macrófagos, são responsáveis pela reabsorção óssea, e os osteoblastos, derivados de células mesenquimais pluripotentes, produzem a matriz óssea que posteriormente será mineralizada. Os osteócitos, correspondentes a 90-95% das células ósseas, derivam de osteoblastos e formam uma rede sensorial que responde às tensões mecânicas sofridas pelo esqueleto (12, 13). Até o fim da segunda década de vida, prevalece o processo de formação, levando a ganho de massa óssea (14). Nas mulheres, durante a perimenopausa o processo de reabsorção óssea aumenta significativamente, com perda acentuada de massa óssea (15). Por fim, o envelhecimento também ocasiona um

desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção, com resultante perda de massa óssea (16).

Devido à observação da significativa perda de massa óssea relacionada à menopausa, Albright et al postularam uma participação central do estrogênio na patogênese da OP (17). Com a evolução do conhecimento e da tecnologia, foram descobertas vias celulares envolvidas na formação e reabsorção óssea, que atualmente estão no centro do conhecimento fisiopatológico da OP.

Dentre as diversas vias celulares envolvidas na remodelação óssea, destacam-se pelo conhecimento atual a via RANK-RANKL-OPG de ativação de osteoclastos e a via Wnt de ativação de osteoblastos.

A via RANK-RANKL-OPG (Figura 1) é considerada a principal via de ativação e diferenciação dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea. Os osteoclastos expressam em sua membrana os receptores RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*), que são estimulados pelo ligante solúvel RANKL (*RANK ligand*). A osteoprotegerina (OPG) é o principal fator inibitório desta via e atua ligando-se ao RANKL, assim impedindo que este estimule RANK. RANKL e OPG são produzidos e secretados por osteoblastos e osteócitos. Defeitos genéticos nesta via ilustram sua atuação sobre o metabolismo ósseo em humanos: mutações inativadoras em *RANK* ou em *RANKL* levam a uma doença esquelética Mendeliana chamada osteopetrose. Esta condição, pelo comprometimento da reabsorção óssea, cursa com alta DMO, deformidades esqueléticas e pancitopenia decorrente da ocupação da medula óssea, denotando a relevância desta via no processo de reabsorção óssea (18, 19). O conhecimento desta via levou ao desenvolvimento do denosumabe, anticorpo anti-RANKL, que vem se mostrando altamente eficaz na prevenção clínica de fraturas (20).

Figura 1 – Fatores envolvidos na via de sinalização RANK-RANKL-OPG. Células da linhagem osteoblástica produzem RANKL e osteoprotegerina (OPG). RANKL se liga ao receptor de membrana RANK, presente em pré-osteoclastos e osteoclastos maduros, levando à sua diferenciação, ativação e maior sobrevivência. OPG é um fator inibidor dessa via, liga-se ao RANKL impedindo que este ative RANK. Modificado de Lewiecki et al., 2011 (21), com permissão de *Nature Publishing Group*

A via de sinalização Wnt (Figura 2) estimula a formação de massa óssea através de mecanismos que incluem a diferenciação e sobrevivência de osteoblastos (22). Em seu estado basal, esta via se encontra inibida pelas proteínas esclerostina (SOST) e DKK1, que impedem a ligação de fatores WNT aos receptores de membrana LRP5 ou LRP6. Neste estado basal, há degradação contínua de β -catenina. A formação do complexo WNT-LRP5/6-proteína *frizzled* leva à ativação da via, com aprisionamento de proteínas envolvidas na degradação da β -catenina, que segue então para o núcleo celular, onde participa da regulação de processos transcricionais.

Figura 2 – Fatores envolvidos na via de sinalização Wnt. Fatores ativadores (WNT) e repressores (DKK1, SOST, SFRP4) envolvidos na via de sinalização Wnt em osteoblastos. Fatores que foram identificados por estudos de associação genética (GWAS) de baixa densidade mineral óssea ou risco de fraturas estão destacados em negrito. Modificado de Richards et al., 2012 (22), com permissão de *Nature Publishing Group*

Alguns dos genes envolvidos nessa via tiveram sua função reconhecida através do estudo de síndromes esqueléticas monogênicas em humanos. Em 2001, a descoberta da causa molecular de duas doenças Mendelianas antagônicas em relação à DMO deu início ao estudo da via Wnt na fisiologia óssea (23, 24). Brunkow et al analisaram vinte e dois pacientes com esclerosteose, uma doença monogênica de herança autossômica recessiva caracterizada por alta massa óssea, espessamento cortical ósseo, alargamento mandibular, compressão de nervos cranianos e hipertensão intracraniana. Nesta coorte de pacientes foram detectadas mutações com perda de função no gene *SOST*, que codifica a esclerostina, fator inibitório da via Wnt (23). Gong et al estudaram 28

famílias afetadas pela síndrome osteoporose-pseudoglioma, uma doença monogênica de herança autossômica recessiva que cursa com osteoporose de início na infância e alterações da estrutura ocular como pseudoglioma ou vitreorretinopatia. Utilizando análise de ligação genética (*linkage*), o fenótipo foi associado a mutações com perda de função no gene *LRP5*, receptor de membrana da via Wnt óssea, em homozigose (24).

À semelhança da via RANK, o reconhecimento da importância da via Wnt trouxe avanços no tratamento da osteoporose com o desenvolvimento de medicamentos anabólicos como o romosozumabe, um anticorpo anti-esclerostina com eficácia anti-fratura já demonstrada em estudos clínicos, aguardando ainda liberação para comercialização por órgãos reguladores (25-27).

Outra via intracelular envolvida no desenvolvimento esquelético é a via Notch, cujos mecanismos de ação e atuação ainda não são inteiramente esclarecidos (Figura 3). Notch 1 a 4 são receptores proteicos transmembrana, ativados pelos ligantes canônicos Jagged 1-2 e Delta-like 1,3 e 4. Após sua ativação, ocorre clivagem do domínio nuclear intracelular de Notch (NICD), que segue para o núcleo, onde induz a transcrição de genes-alvo. Os receptores Notch apresentam em sua porção C-terminal um domínio PEST (rico em Prolina, Glutamato, Serina e Treonina), que é necessário para a degradação do NICD após sua ação nuclear, garantindo duração adequada do seu sinal (28).

A ação final da via Notch depende do contexto e das células envolvidas, além do subtipo do receptor Notch. Em células da linhagem osteoblástica em estágio inicial de diferenciação, a ativação de Notch parece inibir a progressão para osteoblastos maduros e a função osteoblástica, levando a uma baixa formação óssea. Em osteoblastos maduros e osteócitos, a ativação de Notch1 estimula a produção de osteoprotegerina e suprime a esclerostina, levando à inibição da osteoclastogênese e estímulo da via Wnt de formação

óssea. Já a ativação de Notch2 leva à maior produção de RANKL, induzindo osteoclastogênese e maior reabsorção óssea (29). Em humanos, diversas mutações no éxon 34 de *NOTCH2*, levando a modificações no domínio PEST e consequente ganho de função da proteína, foram associadas à Síndrome Hajdu-Cheney, que cursa com osteoporose de início precoce e osteólise das falanges distais (30).

Figura 3 – Fatores envolvidos na via de sinalização Notch. Após ligação de fatores Jagged ou Delta-like ao receptor Notch, ocorre clivagem do domínio nuclear intracelular de Notch (NICD), que segue até o núcleo induzindo a transcrição de genes-alvo como os das famílias Hes e Hey. Modificado de Zanotti et al., 2013 (28), com permissão de Bioscientífica Ltda

Sob o ponto de vista endocrinológico, destaca-se o papel do paratormônio (PTH) sobre a remodelação óssea, através de ações diretas e indiretas. Ele atua principalmente sobre PTH1R, um receptor de membrana acoplado à proteína G e presente em osteoblastos e osteócitos. Através de sua ligação a este receptor, o PTH ativa os osteoblastos pela via do AMP cíclico (31). O PTH pode exercer diferentes efeitos sobre a remodelação óssea. A elevação crônica do PTH, como ocorre no hiperparatireoidismo

primário, leva a aumento da reabsorção óssea e efeito negativo sobre o tecido ósseo e sua resistência (32, 33). De maneira antagônica, o estímulo intermitente do PTH tem efeito anabólico sobre o tecido ósseo, com efeito positivo sobre a microarquitetura óssea. Este resultado ocorre por modulação direta sobre a via Wnt, e indiretamente através da regulação de fatores de estímulo anabólico ao tecido ósseo, como IGF1 (*insulin-like growth fator 1*) (34). Este conhecimento levou ao desenvolvimento da teriparatida, análogo do PTH, e da abaloparatida, análogo do PTHrP (que também atua através do receptor PTH1R), cujas propriedades farmacológicas favorecem a ação anabólica sobre o tecido ósseo.

1.2. Herdabilidade e genética da osteoporose

A osteoporose é uma doença multifatorial envolvendo fatores ambientais e genéticos que modulam aspectos qualitativos e quantitativos do tecido ósseo, incluindo a intensidade e equilíbrio de processos como formação, reabsorção e mineralização óssea ao longo dos diferentes períodos da vida. Em 1973, através do estudo de 151 pares de gêmeos dizigóticos e monozigóticos, Smith et al avaliaram a contribuição genética à determinação da massa óssea, medida em rádio por técnica de absorciometria de fótons (35). Posteriormente, Slemenda et al e Arden et al fizeram estudos semelhantes em gêmeos, medindo DMO por DXA em outros sítios, inclusive coluna lombar, fêmur total e colo de fêmur (36, 37). Em conjunto, os resultados destes trabalhos indicam uma contribuição genética para DMO entre 50 e 85%. Para o estudo da contribuição genética ao risco de fraturas, em 1996 Michaelsson et al avaliaram uma população de 33.432 gêmeos pesquisando presença de qualquer fratura, de fratura

osteoporótica e de fratura de fêmur após 50 anos de idade; e Andrew et al avaliaram em 6.570 gêmeas a influência genética sobre o risco de fratura de antebraço. Estes estudos identificaram herdabilidade para fratura entre 27 e 68%, sendo maior para fraturas ocorridas antes dos 70 anos e para fraturas de quadril (38, 39).

O estudo de genes envolvidos na resistência óssea se iniciou a partir de doenças monogênicas raras com grave fenótipo esquelético, como a osteogênese imperfeita e a síndrome osteoporose-pseudoglioma, que cursam com fragilidade óssea, e a doença de Van Buchem, associada à alta massa óssea. Posteriormente, estudos de polimorfismos em genes conhecidamente envolvidos no metabolismo ósseo, como os da via RANK e do receptor de estrogênio, confirmaram sua participação na determinação da densidade mineral óssea e do risco de fraturas na população geral (40, 41).

Na última década, com a evolução de tecnologias de genotipagem em larga escala, surgiram novas possibilidades, destacando-se os estudos de associação genética em escala genômica (*genome-wide association studies*, GWAS) (22). Assim como em outras doenças multifatoriais, estima-se que o componente genético da osteoporose comum se dê pela associação de múltiplas variantes genéticas relativamente comuns na população geral, cada uma exercendo pequena influência sobre o fenótipo. Pela sua característica de analisar milhões de variantes, comparando indivíduos afetados com não afetados sem o viés de hipóteses pré-estabelecidas, os GWAS se apresentaram como um desenho de estudo capaz de identificar novos genes envolvidos em doenças multifatoriais.

Inúmeros GWAS já foram realizados visando estabelecer as bases genéticas da fragilidade óssea. Após um estudo piloto em 2007, dois GWAS pioneiros para osteoporose foram publicados em 2008, tendo identificado conjuntamente cinco loci significativamente associados à DMO (42-44). Destes, quatro se relacionavam a genes

já conhecidos ou supostamente envolvidos no metabolismo ósseo (*RANKL*, *OPG*, *ESR1* e *LRP5*), confirmando a validade da informação gerada por GWAS. Destacando o potencial destes estudos para a descoberta de novos genes envolvidos na patogênese da osteoporose, o quinto *locus* identificado, e posteriormente confirmado por outros GWAS, é atribuído ao gene *ZBTB40*, cuja função biológica ainda não foi estabelecida. Até o presente momento, já foram realizados mais de 20 GWAS estudando massa óssea e/ou fratura, implicando mais de 220 loci e 240 genes candidatos para osteoporose (22, 43-69).

Apesar dos diversos GWAS já publicados, com poder estatístico crescente e descoberta de grande número de genes, as variantes encontradas ainda explicam pouco da variabilidade genética atribuída à osteoporose. O maior GWAS já realizado para osteoporose até o momento, publicado por Kemp et al em 2017, reuniu uma amostra de 142.487 indivíduos e analisou mais de 17 milhões de variantes com frequência do alelo menos comum (*minor allele frequency*, MAF) > 0,1% (68). Para contemplar esse grande número de indivíduos, e levando em consideração o custo e disponibilidade da DXA, foi utilizada uma estimativa da DMO calculada a partir do ultrassom de calcâneo. Apesar da grande população e do grande número de variantes estudadas, este trabalho foi capaz de explicar apenas cerca de 12% da variabilidade genética atribuída à DMO. Este é um fenômeno comumente observado em GWAS e chamado na literatura de “*missing heritability*”, ou a herdabilidade não identificada. Uma das hipóteses para explicar esta observação é a ocorrência de variantes menos frequentes na população geral e com maior impacto no fenótipo (70, 71). Estas variantes podem ocorrer em genes já identificados por GWAS, como observado com *LRP5*. Este gene apresenta um contínuo entre variantes de baixo impacto na massa óssea, identificadas por diversos GWAS, até variantes com alto impacto fenotípico associadas a doenças Mendelianas,

como a síndrome osteoporose-pseudoglioma que cursa com fragilidade óssea de início precoce (72). Entre esses dois extremos existem também variantes ligadas a um fenótipo intermediário de OP, mais grave do que a OP comum, porém sem características sindrômicas das doenças Mendelianas (73-75). Esse espectro de variantes é ilustrado na figura 4.

Figura 4 – Espectro fenotípico da variabilidade genética em *LRP5* e *SOST*. À esquerda, os fenótipos de osteoporose monogênica associados a variantes genéticas com perda de função em *LRP5*; à direita, fenótipos de hiperostose por variantes com ganho de função em *LRP5* ou perda de função em *SOST*. Entre estes extremos, postulam-se diferentes variantes alélicas levando à osteoporose idiopática ou multigênica, ou a fenótipos protetores, com maior DMO. OP, osteoporose; OPPG, síndrome osteoporose-pseudoglioma; SCL, esclerosteose; VBHC, hiperostose cortical de Van Buchem. Adaptado de Balemans e Van Hul, 2007 (76), com permissão de *Oxford University Press*

Interpretando-se o efeito de variantes genéticas dentro de um contínuo de gravidade (efeito) em função de sua ocorrência (frequência), conforme ilustrado na figura 5, observamos em uma extremidade as doenças Mendelianas, causadas por variantes genéticas raras e com alto impacto sobre o fenótipo. No outro extremo encontram-se as doenças comuns, associadas a variantes de prevalência relativamente alta na população, com baixo impacto individual sobre o fenótipo. Estima-se, no meio

deste contínuo, a existência de um fenótipo intermediário, representado por casos extremos de doenças comuns. No caso da osteoporose, enquadram-se neste subgrupo pacientes com baixa DMO desproporcional à idade e outros fatores de risco, e aqueles casos com componente familiar proeminente. Acredita-se que, em relação à osteoporose comum, estes pacientes sejam portadores de variantes genéticas menos prevalentes e com maior impacto no fenótipo (70, 71). A investigação destes pacientes pode levar à identificação destas variantes de impacto intermediário, contribuindo ao conhecimento genético da osteoporose.

Figura 5 – Relação entre frequência e impacto fenotípico de variantes genéticas. No contínuo entre variantes genéticas raras com grande impacto fenotípico (quadrante superior esquerdo) e variantes genéticas comuns com pequeno efeito individual sobre o fenótipo (quadrante inferior direito), destacam-se variantes com baixa frequência e efeito intermediário sobre o fenótipo (centro), objeto de interesse de investigação deste projeto. Modificado de Manolio et al., 2009 (70), com permissão de *Nature Publishing Group*

1.3. Busca de genes candidatos para osteoporose

Conforme mencionado, diferentes variantes genéticas em *LRP5* e *SOST* levam a um contínuo de fenótipos em relação à DMO, da osteoporose monogênica à doença de van Buchen, passando pelo fenótipo comum da osteoporose multigênica e pela osteoporose idiopática (Figura 4) (76). Da mesma maneira, variantes em outros genes identificados por GWAS e/ou relacionados a doenças Mendelianas de aumento ou diminuição da massa óssea podem estar envolvidos na patogênese desse fenótipo intermediário e, portanto, podem ser considerados genes candidatos para fragilidade óssea.

Em outras doenças multifatoriais, os GWAS foram capazes de identificar importantes genes relacionados à sua patogênese (77, 78). Como exemplo na endocrinologia, podemos citar a descoberta da associação entre variantes no gene *FTO* e a obesidade, realizada inicialmente por GWAS (79, 80). Em 2015, oito anos após sua identificação, foi desvendada a ação da variante intrônica em *FTO* aumentando a expressão de dois outros genes, *IRX3* e *IRX5*, a mais de 500 quilobases de distância, resultando em maior número de adipócitos brancos, que armazenam energia, e menor número de adipócitos marrons, que produzem calor (81, 82). Antes desconhecida, esta via relacionada ao balanço energético é agora alvo para o desenvolvimento de tratamentos anti-obesidade.

Um exemplo que denota o potencial dos GWAS na identificação de alvos para novos medicamentos é o caso da via T *helper* 17. Em doenças autoimunes, diversos genes envolvidos nesta via foram identificados por GWAS, levando a um reposicionamento do alvo de medicamentos biológicos para os componentes desta via (83). Nesta linha, foi desenvolvido o secukinumabe, um anticorpo monoclonal que se

liga à interleucina 17A, atualmente indicado para o tratamento da psoríase grave, artrite psoriática e espondilite anquilosante (84-86).

Em endocrinologia, os diversos GWAS realizados para diabetes tipo 2 reconheceram os genes *PPARG*, *ABCC8/KCNJ11* e *GLP1R*, que codificam respectivamente os receptores alvos das classes de medicamentos tiazolidinedionas, sulfonilureias e agonistas do GLP1, reforçando o potencial deste tipo de estudo em identificar alvos para o desenvolvimento de futuros tratamentos (87).

Dentre os genes identificados por GWAS para DMO ou fratura, alguns têm atualmente função estabelecida ou presumida no metabolismo ósseo, como integrantes das vias Wnt e RANK-RANKL-OPG. No entanto, para a maioria deles cuja função ainda é desconhecida, a associação do gene ao sinal identificado por GWAS é presumida a partir da proximidade física ao sinal, faltando estudos que confirmem a relação de causalidade entre variantes nestes genes e alterações do metabolismo ósseo.

Para a identificação de genes associados a casos extremos de OP, fenótipo de interesse deste projeto, outras estratégias foram utilizadas. Neste contexto, a maioria dos estudos realizou sequenciamento de genes candidatos, incluindo principalmente genes associados à OI e à via Wnt. Utilizando métodos de sequenciamento em larga escala, estudos mais recentes foram capazes de identificar novos genes relacionados à osteoporose familiar – *WNT1* e *PLS3* (88, 89). A via Wnt já tinha seu papel bem definido no metabolismo ósseo, mas dentre os inúmeros componentes da família Wnt foi confirmado o envolvimento crucial de *WNT1* na formação óssea (88). *PLS3* codifica a proteína plastina 3, envolvida no funcionamento da actina no citoesqueleto. Sua função no metabolismo ósseo ainda não é bem estabelecida, mas parece ter papel na atividade mecanossensorial dos osteócitos, além de influenciar sua apoptose e a mineralização óssea (89, 90). O uso de metodologias de alta capacidade de

sequenciamento gênico vem permitindo, então, o avanço no conhecimento das bases moleculares da fragilidade óssea.

Justificativa

A descoberta dos mecanismos moleculares determinantes da resistência óssea tem grande potencial de proporcionar o desenvolvimento de novos medicamentos no tratamento da osteoporose, conforme bem exemplificado pelo denosumabe, anticorpo anti-RANKL já disponível como tratamento eficaz na prevenção de fraturas, e pelo romosozumabe, anticorpo anti-esclerostina, com mecanismo anabólico e eficácia clínica comprovada.

Na prática clínica, a identificação de causas genéticas de endocrinopatias também pode mudar o manejo clínico do paciente e de seus familiares. Como exemplo, a identificação de causas genéticas de feocromocitoma levou à reformulação dos protocolos de manejo clínico: a busca de causas moleculares está atualmente indicada em grande parte dos pacientes, com capacidade de antever comportamento tumoral, risco de novo acometimento e envolvimento sindrômico de outros órgãos e sistemas, alterando assim o tratamento e seguimento do paciente e de seus familiares (91, 92).

De forma análoga, espera-se que o conhecimento da fisiopatologia molecular da osteoporose possa determinar o tratamento mais adequado a cada paciente, dentre as diversas opções terapêuticas disponíveis atualmente e as em desenvolvimento. O melhor conhecimento dos fenótipos associados a diferentes variantes genéticas pode permitir um seguimento clínico personalizado dos familiares carreadores, como monitorização de vitamina D e ingesta de cálcio desde a infância, idade de início de seguimento com DXA, orientações sobre risco de fratura e indicações mais precisas para o início e interrupção de tratamento medicamentoso.

Assim, torna-se importante o conhecimento dos mecanismos moleculares das doenças comuns para o desenvolvimento de terapêuticas e seguimentos clínicos individualizados, tanto para os portadores da doença, como para os familiares carreadores do genótipo de risco.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a prevalência de variantes potencialmente patogênicas em genes candidatos para fragilidade óssea em uma coorte de pacientes com quadros extremos de osteoporose não-sindrômica.

2.2. Objetivos específicos

1. Selecionar genes candidatos para osteoporose, identificados a partir de estudos de associação genética em escala genômica e de fatores reconhecidamente envolvidos na determinação genética da fragilidade óssea (doenças Mendelianas, osteoporose idiopática ou familiar, modelos animais);
2. Pesquisar a presença de variantes alélicas potencialmente patogênicas nestes genes candidatos, em indivíduos com osteoporose grave, familiar ou idiopática, através de sequenciamento paralelo em larga escala;

3. Métodos

3.1 Casuística

Foram convidados a participar deste projeto pacientes com diagnóstico de osteoporose grave, familiar e/ou idiopática em seguimento no ambulatório de doenças osteometabólicas (DOM) da Divisão de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no ambulatório de DOM do serviço de Endocrinologia do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (HSCM-SP), ou encaminhados por colegas endocrinologistas ou reumatologistas. Aqueles que se encaixaram nos critérios de seleção, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram incluídos no projeto de pesquisa “Diagnóstico Molecular das Doenças do Metabolismo Ósseo”, aprovado pela CAPPesq HCFMUSP em 07/06/2013 (Registro: 10666; Aprovação CAPPesq no Apêndice). Familiares de pacientes também foram incluídos para estudo de segregação das variantes encontradas, após consentimento informado.

3.1.1. Diagnóstico clínico

A medida da densidade mineral óssea foi feita por DXA, seguindo-se as orientações vigentes (93, 94). De acordo com a recomendação da Sociedade Internacional para Densitometria Clínica (ISCD), atualizada em 2015, as seguintes definições foram utilizadas:

- Diagnóstico de osteoporose (OP) em mulheres após a menopausa ou homens acima de 50 anos de idade com T-escore $\leq -2,5$ em qualquer um dos sítios densitométricos estabelecidos (coluna lombar, colo femoral ou fêmur total);
- Diagnóstico de baixa massa óssea para a idade (BMOI) em mulheres antes da menopausa ou homens com menos de 50 anos de idade com Z-escore $\leq -2,0$ (em relação a indivíduos do mesmo sexo e idade) ou;
- Diagnóstico de OP ou BMOI idiopática em homens de qualquer idade ou mulheres pré-menopausa quando não identificadas causas de OP secundária (por definição não se faz diagnóstico de osteoporose idiopática em mulheres pós-menopausadas).

Conforme sugerido por Siris et al, adultos com fratura de fragilidade estabelecida foram considerados, para fins de inclusão na casuística, como portadores de OP (7). Fraturas de fragilidade foram definidas como aquelas ocasionadas por trauma equivalente ou inferior a uma queda da própria altura (95). Fraturas vertebrais foram classificadas de acordo com o método semi-quantitativo de Genant, que define e classifica as fraturas de acordo com a morfologia e a redução da altura vertebral: fraturas grau 1 têm redução entre 20 e 25% da altura vertebral, grau 2 entre 25% e 40%, e grau 3 superior a 40% (96).

A fim de selecionar indivíduos com osteoporose grave, familiar ou idiopática, os seguintes critérios de inclusão e exclusão foram obedecidos:

Critérios de inclusão:

- Indivíduos com OP ou BMOI grave (T-escore ou Z-escore $\leq -4,0$); e/ou
- Indivíduos com OP ou BMOI idiopática; e/ou

- Indivíduos com diagnóstico de OP ou BMOI e história familiar (primeiro grau) de OP/BMOI idiopática ou grave

Critérios de exclusão:

Foram excluídos indivíduos em que foram identificadas uma ou mais causas de OP/BMOI secundária, dentre as seguintes (95):

- Estados de hipogonadismo: insensibilidade androgênica, anorexia nervosa, bulimia, amenorreia hipotalâmica, hiperprolactinemia, pan-hipopituitarismo, insuficiência ovariana prematura, síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter, uso crônico de análogos de GnRH;
- Doenças do metabolismo ósseo: hiperparatireoidismo, raquitismo, osteomalácia, doença de Paget, displasia fibrosa óssea;
- Doenças endocrinológicas: acromegalia, insuficiência adrenal, hipercortisolismo endógeno, tireotoxicose;
- Doenças reumatológicas: espondilite anquilosante, artrite reumatoide;
- Doenças gastrointestinais: gastrectomia, doença intestinal inflamatória, síndromes de má-absorção, doença celíaca, cirrose biliar primária;
- Doenças hematológicas: anemia falciforme, talassemia, hemofilia, leucemias e linfomas, mieloma múltiplo, mastocitose sistêmica;
- Medicamentos: uso atual de imunossupressores, uso contínuo (atual ou no último ano) de corticosteroide sistêmico em dose equivalente ou superior a 7,5 mg de prednisona por dia, uso crônico de anticonvulsivantes ou anticoagulantes, uso atual de drogas citotóxicas;

- Outras: alcoolismo, imobilização prolongada, transplante de órgãos, doença renal crônica, doença pulmonar obstrutiva crônica, esclerose múltipla, doença neuro-degenerativa, doença granulomatosa sistêmica ou de depósito.

A investigação destas causas secundárias de OP/BMOI foi realizada através de anamnese e exame físico, e de exames rotineiros no diagnóstico de osteoporose: determinação dos níveis séricos de cálcio total, cálcio iônico, albumina, fósforo, creatinina, fosfatase alcalina, TSH, 25-hidróxi-vitamina D, PTH, proteína C reativa e testosterona nos homens; hemograma, dosagem de IgA total e anticorpo anti-endomísio, e determinação da excreção urinária de cálcio em 24 horas (95, 97, 98).

Para análise de segregação entre fenótipo e genótipo, familiares dos casos índices foram convidados a participar deste estudo. Após assinatura de consentimento informado, controles familiares foram submetidos a um questionário específico para OP e à DXA.

3.2. Obtenção de amostras de DNA

Após a assinatura do termo de consentimento informado, foram coletados 10 mL de sangue de cada paciente ou familiar para extração de DNA genômico leucocitário através de adaptação da técnica de “*salting out*”. A extração foi realizada no Laboratório de Investigação Médica 18 (LIM-18). Em casos selecionados o processo foi realizado a partir de amostras de saliva, utilizando o kit Oragene-DNA OG-500 da DNA Genotek Inc. Todas as amostras foram anonimizadas e identificadas por números para armazenamento a -20°C até utilização.

3.3. Análise molecular

3.3.1. Seleção de genes candidatos

A busca de genes candidatos foi realizada a partir de pesquisa sistemática na base de dados PubMed utilizando combinações dos termos “*osteoporosis*”, “*gene*”, “*genetics*”, “*bone mass*”, “*GWAS*”, “*bone fragility*”, “*fractures*” em busca de artigos originais e de revisão. Para aumentar o escopo da pesquisa, foram realizadas também buscas na base de dados Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®) utilizando termos como “*bone fragility*”, “*osteoporosis*”, “*bone mass*”, “*osteogenesis imperfecta*”, “*osteopetrosis*”, “*van Buchem disease*”.

Foram considerados para inclusão no painel de sequenciamento genes associados à patogênese de doenças Mendelianas com impacto relevante sobre a resistência óssea, genes com variantes implicadas em casos extremos de osteoporose e genes identificados por GWAS, conforme análise dos resultados originais descrita a seguir.

Para fins de padronização, os loci identificados por GWAS foram considerados significativos quando $p < 5 \times 10^{-8}$ (22). Todos loci significativos foram analisados individualmente. Utilizando-se as plataformas dbSNP e Ensembl, foram identificados todos os genes situados a uma distância de até 500 kb dos sinais, e estes foram pesquisados nas bases de dados OMIM, *Entrez Gene* e *Mouse Genome Informatics* (MGI) em busca do conhecimento de sua função biológica à época da pesquisa (2014-2015). Foram selecionados como genes candidatos aqueles mais próximos ao sinal identificado e aqueles com fenótipo esquelético observado em doenças Mendelianas ou em modelos animais. Quando houve divergência entre o gene escolhido por este método

e o mencionado pelo trabalho original ou por revisões subsequentes, foram incluídos todos os genes contemplados.

O número final de 128 genes para a composição do painel foi definido de acordo com o tamanho das sequências e da capacidade da plataforma do sequenciamento paralelo de larga escala, conforme discutido a seguir. Esta etapa do trabalho foi concluída em março de 2015 para possibilitar a elaboração das sondas de captura.

3.3.2. Sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE)

O desenho das sondas de captura foi realizado com o auxílio da ferramenta *online* SureDesign (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), usando como referência a versão 19 do genoma humano (GRCh37, Fev2009). A frequência mínima de cobertura (*tiling*) foi definida em 3 vezes. Foi realizada verificação manual da cobertura dos genes selecionados para o painel, com alteração dos parâmetros de mascaramento em 26 genes para garantir uma cobertura superior a 99%. A captura das regiões genômicas de interesse foi realizada utilizando-se o kit SureSelect^{XT} (Agilent Technologies). As sondas de captura foram produzidas a partir de cRNA biotinilado, com 120 nucleotídeos cada, com intuito de cobertura das regiões codificadoras dos genes candidatos e de um mínimo de 25 pares de bases (pb) das junções íntron-éxon.

O total de regiões genômicas incluídas para análise foi definida de tal forma a atingir um tamanho total máximo de sondas de 499 kpb, mantendo-se assim dentro do *tier 1* do kit SureSelect^{XT}, garantindo a viabilidade de custo-benefício deste projeto. Foram desenhadas 9.820 sondas, resultando em 484.078 pb.

Amostras de 3 µg de DNA genômico foram submetidas à ultrassonicação centrada (E220 Focused Ultrasonicator, Covaris, Woburn, MA) a fim de gerar bibliotecas de DNA genômico fragmentado (fragmentos entre 150 e 200 pb), seguindo-se o protocolo do fabricante. Durante o protocolo de captura, identificadores das amostras foram ligados aos fragmentos (*barcoding*).

As sequências das regiões codificadoras dos genes candidatos selecionados foram analisadas na plataforma de SPLE NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA) no Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) do Programa Rede de Equipamentos Multiusuários (PREMiUM), da Faculdade de Medicina da USP. Foi realizado sequenciamento *paired-end* dos fragmentos de 150-200 pb, resultando em arquivos FastQ.

3.3.2.1. Análise bioinformática dos resultados do SPLE

Esta análise foi feita em colaboração com o Dr. Antonio M. Lerario, da Universidade de Michigan, utilizando-se um *pipeline* próprio. A partir dos dados brutos contidos em arquivos FastQ, foi realizado o alinhamento dos fragmentos pelo *software* BWA (*Burrows-Wheeler Alignment*), tendo como referência a versão 19 do genoma humano (GRCh37, Fev2009). Após alinhamento foram gerados arquivos BAM, estes submetidos a análise pelo *software* Platypus para identificação de variantes. Anotação das variantes foi realizada utilizando-se a ferramenta ANNOVAR, gerando uma planilha contendo informações relativas a todas as variantes identificadas em todos os indivíduos analisados na mesma corrida. Ao total foram realizadas duas corridas incluindo os indivíduos deste projeto e de um projeto paralelo com pacientes portadores

de OI. Na primeira e segunda corridas, foram sequenciados, respectivamente, 17 e 20 indivíduos deste projeto.

Frente à quantidade de informação gerada pelo SPLE, um dos principais desafios é identificar a(s) variante(s) responsável(is) pelo fenótipo em questão (99, 100). Para padronização do processo de identificação de variantes, protocolos e diretrizes vêm sendo propostos para a análise molecular de doenças Mendelianas (101, 102), porém não existem, até o momento, diretrizes ou recomendações para análise de variantes com penetrância incompleta e/ou associadas a doenças potencialmente oligogênicas.

Para priorização de variantes neste projeto, levou-se em consideração a frequência populacional, o impacto sobre a função da proteína codificada e relatos prévios. Atualmente, existem bancos de dados criados a partir de exomas e/ou genomas sequenciados em diversas populações e que permitem estimar a prevalência populacional das variantes. Alguns deles, como o *Genome Aggregation Database* (gnomAD), com cerca de 138.000 indivíduos sequenciados, incluem populações de regiões distintas, como africanas, europeias e americanas (100). No nosso meio, o Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM) reúne dados obtidos a partir do sequenciamento exômico de 609 idosos da comunidade de São Paulo (103).

Variantes que levem a alterações em códons de parada ou de início, alterações em sítios de *splicing*, mudança no quadro de leitura dos códons (*frameshift*) ou grandes deleções/duplicações (variantes de número de cópia, *copy number variants*, CNV) são habitualmente consideradas como deletérias, e variantes de ponto sinônimas (troca de um nucleotídeo exônico, mantendo o aminoácido da proteína) e intrônicas consideradas como benignas. Para a análise de variantes de ponto não sinônimas (que levam à troca de um aminoácido na proteína) são utilizadas ferramentas *in silico* com diferentes métodos para predição do seu impacto sobre a proteína.

Dentre as ferramentas *in silico* disponíveis, algumas são baseadas no grau de conservação da sequência proteica, como *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT), que classifica as variantes como deletérias ou toleradas (104). Outra ferramenta comumente utilizada, *Polymorphism phenotyping version 2* (PolyPhen2) avalia o efeito das variantes sobre sequência e estrutura proteicas, classificando-as como provavelmente deletérias, possivelmente deletérias ou benignas (105). Outras ferramentas integram múltiplas informações, como *Combined Annotation-Dependent Depletion* (CADD) que avalia conservação, dados funcionais e inclui a análise de outras ferramentas *in silico*, conferindo escores escalonados (*C-scores*) às variantes, de forma que um escore ≥ 10 representa variantes entre as 10% mais deletérias, e ≥ 20 entre as 1% mais deletérias. O valor de corte sugerido para a análise de variantes pelo CADD é um escore ≥ 15 (106).

Por fim, para a pesquisa da associação prévia de determinadas variantes a um fenótipo em humanos, existem também bancos de dados disponíveis *online*, como *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), ClinVar e *Human Gene Mutation Database* (HGMD), além da possibilidade de pesquisa de variantes publicadas na literatura (107-109).

Neste projeto, os seguintes critérios foram utilizados para seleção de variantes de interesse:

- Seleção de variantes presentes em heterozigose, homozigose e/ou hemizigose, de acordo com tipo de herança previsto;
- Seleção de variantes com frequência menor ou igual a 1% nas seguintes bases populacionais: 1000 Genomes, gnomAD e ABraOM;
- Seleção de variantes com frequência máxima de 10% dos alelos sequenciados na nossa coorte. Este limiar foi escolhido levando-se em consideração que foi sequenciado um grupo de pacientes com o mesmo fenótipo, portanto mais de um

paciente poderia apresentar a mesma variante patogênica, e pela presença de famílias na coorte, o que aumenta o número total de possíveis carreadores de uma mesma variante;

- Seleção de variantes com provável impacto deletério sobre a proteína:
 - variantes com ganho de códon de parada, pequenas deleções ou inserções;
 - variantes não sinônimas preditas como deletérias por diferentes ferramentas *in silico* (SIFT, PolyPhen2, CADD);
 - variantes próximas aos limites éxon/íntron, com predição de alteração de *splicing* de acordo com diferentes ferramentas (NNSPLICE 0.9, Human Splicing Finder 3.0, NetGene2).

Todas as variantes de interesse foram confirmadas visualmente no programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV), a partir do arquivo BAM, e foi realizada pesquisa de relatos prévios de ocorrência destas variantes nas seguintes bases de dados: PubMed, OMIM, *Human Gene Mutation Data* (HGMD), *Leiden Open Variant Database* (LOVD), ClinVar, *Osteogenesis Imperfecta Variant Database* (OIVD).

3.3.3. Sequenciamento confirmatório pelo método de Sanger

Variantes de interesse de ponto ou pequenas deleções foram confirmadas nos casos índices e familiares por sequenciamento automático pelo método de Sanger. Resumidamente, a região foi amplificada a partir de amostras de DNA genômico pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando PCR Master Mix

(Promega). Após verificação da especificidade e rendimento da reação por eletroforese em géis de agarose, os produtos de PCR foram purificados enzimaticamente com *ExoProStar* (GE Healthcare Life Sciences) e submetidos à reação de sequenciamento utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1* (Life Technologies). O sequenciamento automático por eletroforese capilar foi realizado no equipamento ABI 3130xl (Life Technologies) e os eletroferogramas analisados no software *Sequencher v4.6*.

3.3.4. Análise de variantes de número de cópia

A partir dos dados obtidos pelo SPLE, foram pesquisadas variantes de número de cópias (CNVs) utilizando-se o *software Copy Number Analysis for Targeted Resequencing* (CONTRA) (110). Como controle, foram usadas as amostras de pacientes com OI analisadas na mesma corrida e com variantes patogênicas identificadas pela análise inicial. Possíveis CNVs identificadas pelo CONTRA foram analisadas visualmente no IGV, e aquelas que se mantiveram suspeitas foram submetidas à análise confirmatória pelo método de Sanger (CNVs inferiores a 700 pb) ou por *array* citogenômico (CNVs superiores a 700 pb).

Array citogenômico foi realizado em colaboração com a Dra. Leslie Kulikowski, do Laboratório de Citogenômica, LIM-03, FMUSP, utilizando-se o CytoSNP-850K da Illumina (San Diego, California, EUA), que contempla 843.888 marcadores. Neste método, a distância média entre as sondas é 1.800 pb, sendo necessário observar-se alteração de sinal em 10 sondas seguidas para se identificar uma CNV, resultando em uma resolução efetiva média de 18 kb. Os dados foram extraídos pelo iScan System (Illumina), e foram usadas como referência amostras controle previamente analisadas.

Os dados brutos foram inseridos no *software* BlueFuse Multi v1.1 (Blue Gnome) para normalização e cálculo de razões $\log_2$, equivalentes ao quociente da intensidade normalizada da amostra pela intensidade média da amostra de referência. Para análise de patogenicidade, as CNVs confirmadas foram pesquisadas nas bases de dados *University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser*, DECIPHER GRCh37 e *Database of Genomic Variants (DGV)*.

3.3.5. Análise de segregação familiar

Com o objetivo de estudar a segregação de fenótipo com genótipo, foram convidados a participar do estudo familiares de primeiro grau dos casos índices com variantes de interesse identificadas a partir do SPLE. Para caracterização fenotípica foi realizada história clínica direcionada aos antecedentes de fratura, diagnóstico de OP e possíveis causas secundárias de OP, e todos os controles familiares foram submetidos à DXA. A análise molecular foi feita pelo método de Sanger, conforme descrito.

A interpretação dos dados obtidos com a segregação familiar foi feita de maneira individualizada para cada família. Variantes foram excluídas quando observada segregação genótipo/fenótipo incompatível com a patogenicidade da variante. Quando a segregação seguiu o padrão esperado para uma variante patogênica (todos indivíduos com OP apresentavam a variante, e todos sem OP não apresentavam a variante), foi considerado que a análise de segregação favoreceu a patogenicidade da variante. Por fim, em famílias cuja análise permite mais de uma interpretação acerca da patogenicidade das variantes, estas foram consideradas como inconclusivas.

4. Resultados

4.1. Seleção de genes candidatos

Foram incluídos 128 genes para compor o painel de sequenciamento, selecionados a partir de pesquisa na literatura médica realizada até março de 2015 (Tabela 1). Os genes candidatos selecionados serão apresentados a partir do tipo de associação com fragilidade óssea, a saber: a) doenças Mendelianas, b) casos de osteoporose grave, familiar ou idiopática, e c) GWAS.

Tabela 1 – 128 genes incluídos no painel de SPLE, de acordo com o motivo de inclusão

Tipo de associação à fragilidade óssea	Genes
Genes associados a doenças Mendelianas com alto impacto sobre a resistência óssea	<i>BMP1, CA2, CLCN7, COL1A1, COL1A2, CRTAP, CTSK, FBN1, FKBP10, IFITM5, LRP4, LRP5, LRP6, NOTCH2, OSTM1, P3H1, P4HB, PLEKHM1, PLOD2, PLOD3, PPIB, PTDSS1, PTDSS2, SEC24D, SERPINF1, SERPINH1, SLC29A3, SLC34A1, SLC9A3R1, SNX10, SOST, SP7, TCIRG1, TMEM38B, TNFRSF11A, TNFSF11, WNT1</i>
Genes associados à osteoporose idiopática e/ou familiar	<i>DKK1, LRP5, MTHFR, PLS3, WNT1, WNT3A</i>
Genes associados com densidade mineral óssea ou com risco de fratura osteoporótica a partir de estudos de associação genética em escala genômica (GWAS)	<i>ABCF2, ABL1, ADAMTS18, ALDH7A1, ANAPC1, ANOS1, ARHGAP1, AXIN1, C17orf53, C7orf76, CCDC170, CDC5L, CKAP5, CLCN7, CLDN14, COLEC10, CPED1, CPN1, CREB3L1, CRHR1, CTNBN1, CYLD, DCDC1, DCDC5, DHH, DKK1, DLX5, DLX6, DMP1, DNM3, DSPP, ERC1, ESR1, F2, FAM210A, FAM3C, FAM9A, FAM9B, FKBP11, FOXC2, FOXL1, FUBP3, GALNT3, GPATCH1, GPR68, HDAC5, IBSP, IDUA, INSIG2, JAG1, KCNMA1, LACTB2, LEKR1, LGR4, LIN7C, LRP4, LRP5, MARK3, MEF2C, MEPE, MPP7, NBR1, NTAN1, PDXDC1, PKDCC, PTHLH, RPS6KA5, RSPO3, RUNX2, SALL1, SHFM1, SLC29A3, SMG6, SMOC1, SOST, SOX4, SOX6, SOX9, SP7, SPPI, SPTBN1, STARD3NL, SUCO, SUPT3H, TCIRG1, TMEM263, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFSF11, TTC21B, USF3, WLS, WNT16, WNT5B, XKR9, ZBTB40, ZNF408</i>

4.1.1. Genes candidatos selecionados a partir de doenças Mendelianas

Foram selecionados 37 genes previamente associados a doenças Mendelianas com comprometimento da resistência óssea, apresentados na Tabela 2.

Foram incluídos genes associados a doenças com comprometimento da matriz óssea, representadas principalmente pela osteogênese imperfeita (OI), com ao menos 14 genes já implicados em sua patogênese. Outras doenças acometendo matriz óssea incluídas foram as síndromes de Bruck e de Cole-Carpenter, que cursam com fragilidade óssea e cujas bases genéticas se sobrepõem à da OI, conforme observado pelos genes *FKBP10* e *SEC24D*, com diferentes defeitos genéticos associados a OI ou síndrome de Bruck, e OI ou síndrome de Cole-Carpenter, respectivamente (111, 112).

Foram incluídos também genes associados a alterações da remodelação óssea, representados por doenças Mendelianas que cursam com baixa ou alta DMO. São exemplos os genes relacionados à osteopetrose e à picnodisostose, doenças de alta massa óssea devido a defeitos na reabsorção óssea. Genes participantes da via Wnt também estão representados por doenças Mendelianas de baixa ou alta DMO. Outras doenças foram consideradas devido ao fenótipo de alteração da resistência óssea, como disosteosclerose e síndrome de Lenz-Majewski, e os genes associados foram incluídos como candidatos.

Tabela 2 – Genes associados a doenças Mendelianas com alteração de resistência óssea

Gene	Id OMIM	Função atribuída à proteína	Tipo de herança	Doença	Fenótipo
<i>COL1A1</i>	120150	Colágeno tipo 1	AD		
<i>COL1A2</i>	120160	Colágeno tipo 1	AD		
<i>BMP1</i>	112264	Clivagem do C-propeptídeo	AR		
<i>CRTAP</i>	605497	Hidroxilação do colágeno	AR		
<i>FKBP10</i>	607063	Processamento do colágeno	AR		
<i>IFITM5</i>	614757	Mineralização	AD		
<i>P3H1</i>	610339	Hidroxilação do colágeno	AR	Osteogênese imperfeita	Baixa massa óssea e aumento do risco de fraturas; gravidade varia de letalidade perinatal a assintomática; acometimentos extra-esqueléticos incluem esclera azulada, dentinogênese imperfeita e perda auditiva
<i>PPIB</i>	123841	Hidroxilação do colágeno	AR		
<i>SEC24D</i>	607186	Processamento do pró-colágeno	AR		
<i>SERPINF1</i>	172860	Chaperoneamento do colágeno	AR		
<i>SERPINH1</i>	600943	Mineralização	AR		
<i>SP7</i>	606633	Regulação de Ob	AR		
<i>TMEM38B</i>	611236	Canal de cátion	AR		
<i>WNT1</i>	164820	Ativação de Ob / Agonista da via Wnt	AR		
<i>SEC24D</i>	607186	Processamento do pró-colágeno	AR	Sd de Cole-Carpenter	Fragilidade óssea; craniossinostose; proptose ocular; hidrocefalia; fácies característica
<i>P4HB</i>	176790	Processamento do pré-pró-colágeno	AD		
<i>FKBP10</i>	607063	Processamento do colágeno	AR	Sd de Bruck	Contraturas congênitas; fraturas de início precoce; baixa estatura; deformidade grave de membros; escoliose progressiva
<i>PLOD2</i>	601865	Processamento do pró-colágeno	AR		
<i>CTSK</i>	601105	Função do Oc	AR	Picnodisostose	Baixa estatura; deformidades cranianas; acroosteólise; alta massa óssea; risco aumentado de fraturas
<i>NOTCH2</i>	600275	Sinalização da via Notch	AD	Sd de Hajdu-Cheney	OP; baixa estatura; acroosteólise; fácies característica
<i>SLC29A3</i>	224300	Transportador de nucleosídeos	AR	Disosteoesclerose	Osteoesclerose; platispondilia; baixa estatura; risco aumentado de fraturas; atrofia macular da pele
<i>PLOD3</i>	603066	Hidroxilação do colágeno	AR	Deficiência de lisil-hidroxilase 3	Insuficiência de crescimento, fácies característica, deformidades esqueléticas e osteoporose

continua

Tabela 2 – Genes associados a doenças Mendelianas com alteração de resistência óssea (*conclusão*)

Gene	Id OMIM	Função atribuída à proteína	Tipo de herança	Doença	Fenótipo
<i>TCIRG1</i>	604592	Função do Oc	AR	Osteopetrose	Alta massa óssea; deformidades esqueléticas; compressão de estruturas nobres; ocupação da medula óssea; idade de início e gravidade variáveis
<i>CLCN7</i>	602727	Função do Oc	AD/AR		
<i>OSTM1</i>	607649	Homeostase do Oc	AR		
<i>PLEKHM1</i>	611466	Função do Oc	AR		
<i>CA2</i>	611492	Função do Oc	AR		
<i>SNX10</i>	614780	Homeostase do Oc	AR		
<i>TNFRSF11A</i>	603499	Ativação do Oc (RANK)	AD/AR		
<i>TNFSF11</i>	602642	Ativação do Oc (RANKL)	AR		
<i>SOST</i>	605740	Ativação de Ob / Antagonista da via Wnt	AR	Esclerosteose, Doença de van Buchem	Alta massa óssea; maior resistência óssea; compressão de estruturas nobres; aumento mandibular; sindactilia; alta estatura
<i>LRP4</i>	604270	Regulador da sinalização de Wnt	AD/AR	Esclerosteose tipo 2	Prognatismo; sindactilia; compressão de nervos cranianos; esclerose de vértebras e crânio; hiperostose de ossos longos
<i>LRP5</i>	603506	Ativação de Ob / Receptor da via Wnt	AD	Hiperostose endosteal	Alta massa óssea; aumento da resistência óssea; mandíbula alargada; <i>torus palatinus</i>
			AR	Sd osteoporose-pseudoglioma	OP de início precoce; pseudoglioma ocular ou vitreorretinopatia
<i>LRP6</i>	603507	Ativação de Ob / Receptor da via Wnt	AD	Doença arterial coronariana AD	Doença arterial coronariana precoce, sd metabólica, OP
<i>PTDSS1</i>	612792	Enzimas presentes no RE, possível envolvimento no metabolismo ósseo	AD	Sd de Lenz-Majewski	Hiperostose craniotubular; déficit intelectual; deformidades em mãos e pés; fácies característica
<i>PTDSS2</i> ¹	612793		NA		
<i>SLC34A1</i>	182309	Cotransportador sódio-fosfato	AD	Osteoporose hipofosfatêmica com nefrolitíase	Hipofosfatemia persistente devido a defeito na reabsorção renal de fósforo, associada a osteoporose e/ou nefrolitíase
<i>SLC9A3R1</i>	604990	Regulação do trocador sódio-hidrogênio	AD		
<i>FBN1</i>	134797	Componete estrutural de microfibrilas do tec. conjuntivo	AD	Sd de Marfan	Alta estatura, deformidade torácica e da coluna vertebral, hipermobilidade articular, risco elevado de osteoporose

¹PTDSS2 atua em conjunto com PTDSS1, o fenótipo foi descrito em associação a defeitos neste último.

AD, autossômico dominante; AR, autossômico recessivo; Id OMIM, identificador do online Mendelian inheritance in man; NA, não se aplica; Ob, osteoblasto; Oc, osteoclasto; OP, osteoporose; RANK, receptor activator of nuclear factor kappa-β; RANKL, RANK ligand; RE, retículo endoplasmático; Sd, síndrome; tec., tecido

4.1.2. Genes candidatos selecionados a partir de fenótipos extremos de osteoporose

Foram analisados 14 artigos de investigação molecular em pacientes com casos extremos de OP, com identificação de variantes patogênicas em sete genes diferentes, incluídos no painel deste projeto: *COL1A1*, *DKK1*, *LRP5*, *MTHFR*, *PLS3*, *WNT1* e *WNT3A*. Um resumo das características destes trabalhos se encontra na Tabela 3.

Tabela 3 – Genes incluídos no painel por sua associação a formas extremas de osteoporose

Gene	Condição da variante	Função atribuída à proteína	Fenótipo	Desenho do estudo	Referência
<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	Heterozigose	Colágeno tipo 1	Baixa massa óssea idiopática	Análise de genes candidatos (2 genes)	Spotila et al, 1991 (113) Spotila et al, 1994 (114)
<i>LRP5</i>	Heterozigose	Receptor da via Wnt	OP idiopática em homens	Análise de genes candidatos (1 gene)	Crabbe et al, 2005 (115)
			Osteoporose juvenil	Análise de genes candidatos (3 genes)	Hartikka et al, 2005 (73)
			Fraturas vertebrais no puerpério	Análise de genes candidatos (2 genes)	Cook et al, 2014 (74)
			Osteoporose juvenil idiopática	Sequenciamento exômico, análise focada em genes candidatos (14 genes)	Fahiminiya et al, 2013 (116)
<i>DKK1</i>	Heterozigose	Antagonista da via Wnt	Osteoporose juvenil	Análise de genes candidatos (8 genes)	Korvala et al, 2012 (117)
<i>WNT3A</i>	Heterozigose	Agonista da via Wnt	Osteoporose juvenil	Análise de genes candidatos (8 genes)	Korvala et al, 2012 (117)
<i>MTHFR</i>	Heterozigose	Metabolismo da homocisteína	Fraturas vertebrais no puerpério	Análise de genes candidatos (2 genes)	Cook et al, 2014 (74)
<i>PLS3</i>	Hemizigose ou heterozigose	Componente do citoesqueleto de osteoclastos	Osteoporose ligada ao X	Estratégias de sequenciamento em larga escala	Fahiminiya et al, 2014, Laine et al, 2015, van Dijk et al, 2013 (89, 118, 119)
<i>WNT1</i>	Heterozigose	Agonista da via Wnt	Osteoporose AD de início precoce	Estratégias de sequenciamento em larga escala	Laine et al, 2013 (88), Keupp et al, 2013 (120)

AD, herança autossômica dominante.

4.1.3. Genes candidatos selecionados a partir de estudos de ligação em escala genômica (GWAS)

Foram analisados 25 GWAS para fragilidade óssea (43-67, 69). A partir destes estudos, 65 loci alcançaram o nível de significância pré-estabelecido de $p < 5 \times 10^{-8}$. Análise destes loci resultou na inclusão de 95 genes, listados na Tabela 4.

Dentre os 95 genes identificados por GWAS e incluídos no painel de sequenciamento, oito (8%) já foram associados, em humanos, a síndromes monogênicas com alteração de massa óssea, e 18 (19%) a outras doenças Mendelianas com alguma alteração no fenótipo esquelético e/ou no metabolismo ósseo. Dos genes sem evidência de impacto sobre o metabolismo ósseo ou desenvolvimento esquelético em humanos, em 18 (19%) este fenótipo foi observado em modelos animais. Dentre os demais é reconhecido ou suposto um papel na fisiologia esquelética em mais 4 genes (4%). Para os restantes quarenta e sete genes (49,5%) a única evidência de participação no metabolismo ósseo, até o momento, é proveniente de GWAS. Informações sobre os genes candidatos identificados por GWAS estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Genes incluídos no painel de sequenciamento a partir de GWAS

Gene	p para BMD (p para fratura)	SNP	Envolvimento na fisiopatologia óssea	Fenótipo em humanos, tipo de herança	Fenótipo esquelético observado em camundongos com <i>knock-out</i> do gene	Referências
<i>ABCF2</i>	$7,3 \times 10^{-9}$	rs7812088	ND	ND	SAD	GEFOS2 (61)
<i>ABL1</i>	$3,4 \times 10^{-22}$	rs7851693	ND	Sd com defeitos cardíacos e malformações esqueléticas (escoliose, pectus excavatum, deformidade em pés), AD	Alterações na maturação dos osteoblastos, osteoporose	GEFOS2
<i>ADAMTS18</i>	$2,1 \times 10^{-8}$	rs16945612	ND	Sd com microcórnea e telecanto, AR	SAD	Xiong 2009 (51)
<i>ALDH7A1</i>	$6,4 \times 10^{-6}$ ($2,1 \times 10^{-9}$)	rs13182402	ND	Epilepsia dependente de piridoxina, AR	SAD	Guo 2010 (54)
<i>ANAPC1</i>	$1,5 \times 10^{-9}$	rs17040773	ND	ND	ND	GEFOS2
<i>ANOS1 (KAL1)</i>	$1,2 \times 10^{-8}$	rs5934507	ND	Hipogonadismo hipogonadotrófico, XLR	ND	GEFOS2
<i>ARHGAP1</i>	$5,1 \times 10^{-18}$	rs7932354	ND	ND	Osteoporose, anormalidades de morfologia do corpo vertebral	GEFOS1 (47), GEFOS2
<i>AXIN1</i>	$1,0 \times 10^{-16}$	rs9921222	Regulador negativo da via Wnt	Anomalia de duplicação caudal (causada por alterações epigenéticas)	Anormalidades vertebrais e cranianas	GEFOS2
<i>C17orf53</i>	$1,7 \times 10^{-8}$	rs228769	ND	ND	SAD	GEFOS1
<i>C7orf76^l</i>	$8,1 \times 10^{-48}$ ($5,9 \times 10^{-11}$)	rs4727338	ND	ND	SAD	GEFOS1, GEFOS2
<i>CCDC170</i>	$4,0 \times 10^{-35}$	rs4869742	ND	ND	ND	Styrkarsdottir 2008 & 2009 (44, 48), GEFOS1, GEFOS2
<i>CDC5L</i>	$5,6 \times 10^{-11}$	rs11755164	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>CKAP5</i>	$5,1 \times 10^{-18}$	rs7932354	ND	ND	SAD	GEFOS1, GEFOS2
<i>CLCN7</i>	$1,5 \times 10^{-16}$	rs13336428	Funcionamento de Oc	Osteopetrose, AR ou AD	Osteopetrose, falência da erupção dentária	GEFOS2
<i>CLDN14</i>	$4,2 \times 10^{-9}$	rs170183	ND	Surdez, AR	SAD	Zhang 2014 (66)
<i>COLEC10</i>	$3,2 \times 10^{-39}$	rs2062377	ND	Sd 3MC – dismorfismo facial, fenda palatina, baixa estatura, déficit cognitivo, craniossinostose e sinostose radioulnar, AR	SAD	Styrkarsdottir 2008, Richards 2008 (43), GEFOS1, GEFOS2
<i>CPED1</i>	$6,0 \times 10^{-11}$	rs13245690	ND	ND	ND	GEFOS2, Zheng 2012 & 2015 (62, 69)
<i>CPN1</i>	$9,0 \times 10^{-10}$	rs7084921	ND	Angioedema ou urticária crônicos, AR	SAD	GEFOS2
<i>CREB3L1</i>	$5,1 \times 10^{-18}$	rs7932354	ND	ND	Redução da mineralização óssea, redução das espessuras trabecular e cortical, alteração da morfologia e diferenciação dos Ob	GEFOS1, GEFOS2
<i>CRHR1</i>	$1,4 \times 10^{-8}$	rs9303521	ND	ND	SAD	GEFOS1
<i>CTNBN1</i>	$4,4 \times 10^{-25}$	rs430727	Ativada pela via Wnt	Déficit cognitivo, AD Vitreorretinopatia exsudativa, AD	Anormalidades esqueléticas, elevação da DMO, mineralização óssea anormal	GEFOS1, GEFOS2
<i>CYLD</i>	$1,9 \times 10^{-22}$	rs1566045	ND	Cilindromatose familiar, AD	SAD	GEFOS2
<i>DCDC1</i>	$2,2 \times 10^{-11}$	rs163879	ND	ND	ND	GEFOS1, GEFOS2

Continua

Tabela 4 – Genes incluídos no painel de sequenciamento a partir de GWAS (*continuação*)

Gene	p para BMD (p para fratura)	SNP	Envolvimento fisiopatologia óssea	Fenótipo em humanos	Modelos animais (fenótipo esquelético observado em camundongos)	Referências
<i>DCDC5</i>	2,2x10 ⁻¹¹	rs163879	ND	ND	SAD	GEFOS1, GEFOS2
<i>DKK1</i>	1,6x10 ⁻¹² (9,0x10 ⁻⁹)	rs1373004	Antagonista da via Wnt	ND	Malformações craniofaciais – ausência de mandíbula e maxila; osso parietal pequeno	GEFOS2
<i>DLX5</i>	8,1x10 ⁻⁴⁸ (5,9x10 ⁻¹¹)	rs4727338	Fator de transcrição envolvido na ativação de Ob	Malformações em pés e mãos (<i>Split-hand/foot</i>), AR	Malformações craniofaciais, alteração na mineralização óssea e diferenciação de Ob	GEFOS1, GEFOS2
<i>DLX6</i>	8,1x10 ⁻⁴⁸ (5,9x10 ⁻¹¹)	rs4727338	ND	ND	Malformações craniofaciais e de pés e mãos	GEFOS1, GEFOS2
<i>DMP1</i>	1,2x10 ⁻²⁷ (1,7x10 ⁻⁸)	rs6532023	Orquestra a formação da matriz óssea por Ob e regula mineralização	Osteomalácia hipofosfatêmica, AR	Alterações na diferenciação de Ob e remodelação óssea, alterações na mineralização dentária, anormalidades esqueléticas	Duncan 2011 (59), GEFOS2
<i>DNM3</i>	8,5x10 ⁻¹⁵	rs479336	ND	ND	ND	GEFOS2
<i>DSPP</i>	1,2x10 ⁻²⁷ (1,7x10 ⁻⁸)	rs6532023	Regula mineralização da dentina	Dentinogênese imperfeita, AD; Displasia dentina, AD	Alteração da mineralização dentária	Duncan 2011, GEFOS2
<i>ERC1</i>	5,6x10 ⁻¹²	rs2887571	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>ESR1</i>	4,0x10 ⁻³⁵	rs4869742	Receptor do estrogênio, modula a remodelação óssea	Resistência ao estrogênio, com baixa DMO em homens, AR	Alterações na remodelação óssea e mineralização, baixa DMO, anormalidades esqueléticas	Styrkarsdottir 2008 & 2009, GEFOS1, GEFOS2
<i>F2</i>	5,1x10 ⁻¹⁸	rs7932354	ND	Disprotrombinemia, AR; Trombofilia por defeito na trombina, AD	SAD	GEFOS1, GEFOS2
<i>FAM210A</i>	4,9x10 ⁻⁸ (8,8x10 ⁻¹³)	rs4796995	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>FAM3C</i>	1,0x10 ⁻¹¹	rs7776725	ND	ND	SAD	Cho 2009 (52)
<i>FAM9A</i>	1,2x10 ⁻⁸	rs5934507	ND	ND	ND	GEFOS2
<i>FAM9B</i>	1,2x10 ⁻⁸	rs5934507	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>FKBP11</i>	1,2x10 ⁻¹⁵	rs12821008	ND	ND	Aumento de DMO e CMO	GEFOS2
<i>FOXC2</i>	1,0x10 ⁻¹⁴	rs10048146	ND	Sd linfedema-distiquíase, AD	Anormalidades esqueléticas e de ossificação	GEFOS1, GEFOS2
<i>FOXL1</i>	1,0x10 ⁻¹⁴	rs10048146	ND	ND	SAD	GEFOS1, GEFOS2
<i>FUBP3</i>	3,4x10 ⁻²²	rs7851693	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>GALNT3</i>	4,8x10 ⁻¹⁰	rs6710518	Inibe a degradação do FGF3, envolvido no metabolismo do fósforo	Calcinose tumoral hiperfosfatêmica, AR	Aumento de DMO, da espessura cortical e do número de trabéculas ósseas, alteração da morfologia femoral	Duncan 2011
<i>GPATCH1</i>	6,6x10 ⁻¹¹	rs10416218	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>GPR68</i>	2,0x10 ⁻¹⁵	rs1286083	Possível sensor de pH de Ob	Amelogênese imperfeita, AR	Alterações na diferenciação e fisiologia dos Oc	GEFOS2
<i>HDAC5</i>	1,7x10 ⁻⁸	rs228769	ND	ND	SAD	GEFOS1
<i>IBSP</i>	1,2x10 ⁻²⁷ (1,7x10 ⁻⁸)	rs6532023	Proteína estrutural da matriz óssea, regula mineralização	ND	Anormalidade da microestrutura, remodelação e mineralização óssea, baixa DMO	GEFOS 2

Continua

Tabela 4 – Genes incluídos no painel de sequenciamento a partir de GWAS (*continuação*)

Gene	p para BMD (p para fratura)	SNP	Envolvimento fisiopatologia óssea	Fenótipo em humanos	Modelos animais (fenótipo esquelético observado em camundongos)	Referências
<i>IDUA</i>	5,2x10 ⁻¹⁵	rs3755955	ND	Mucopolissacaridose com disostose multiplex, AR	Malformações esqueléticas, aumento de DMO, aumento do número de Ob	GEFOS2
<i>INSIG2</i>	1,2x10 ⁻¹⁰	rs1878526	ND	ND	ND	GEFOS2
<i>JAG1</i>	3,1x10 ⁻¹⁹	rs3790160	Ligante de Notch	Sd de Alagille, com malformações esqueléticas, AD	Encurtamento maxilar	Kung 2010 (58), GEFOS2
<i>KCNMA1</i>	5,0x10 ⁻¹⁹	rs7071206	ND	Discinesia paroxística e/ou epilepsia, AD	SAD	GEFOS2
<i>LACTB2</i>	1,9x10 ⁻⁸	rs7017914	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>LEKR1</i>	4,5x10 ⁻¹²	rs344081	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>LGR4</i>	1,3x10 ⁻¹⁰	rs587777005	Interação com a via Wnt	ND	SAD	Styrkarsdottir 2013 (64)
<i>LIN7C</i>	4,9x10 ⁻⁸	rs10835187	Interação com a via Wnt	ND	SAD	GEFOS2
<i>LRP4</i>	5,1x10 ⁻¹⁸	rs7932354;	Receptor da via Wnt	Esclerosteose tipo 2, AR ou AD; Sd de Cenani-Lenz, AR	Malformações vertebrais, de patas e dentes, alterações em condrócitos	GEFOS1, GEFOS2
<i>LRP5</i>	2,1x10 ⁻²⁶ (1,4x10 ⁻⁸)	rs3736228	Receptor da via Wnt	Hiperostose endosteal/osteoesclerose, AD; Sd de van Buchem, AD; Sd Osteoporose-pseudoglioma, AR	Malformações esqueléticas, baixa DMO e CMO, alteração da microestrutura, mineralização e remodelação ósseas	GEFOS1, GEFOS2
<i>MARK3</i>	5,2x10 ⁻¹⁶	rs11623869	ND	ND	SAD	Styrkarsdottir 2009, GEFOS1, GEFOS2
<i>MEF2C</i>	4,5x10 ⁻⁶¹	rs1366594	ND	Malformações cerebrais, epilepsia, retardo mental, AD	Malformações esqueléticas, alterações de ossificação e da morfologia trabecular	GEFOS1, Duncan 2011, GEFOS2
<i>MEPE</i>	1,2x10 ⁻²⁷ (1,7x10 ⁻⁸)	rs6532023	Regulação da mineralização óssea	ND	Anormalidades na microarquitetura, remodelação e mineralização ósseas	GEFOS2
<i>MPP7</i>	2,4x10 ⁻¹⁶	rs3905706	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>NBR1</i>	2,0x10 ⁻¹¹	rs4792909	ND	ND	Anormalidades na remodelação, mineralização e micro e macroestruturas ósseas	Styrkarsdottir 2009, GEFOS2
<i>NTANI</i>	1,7x10 ⁻¹⁰	rs4985155	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>PDXDC1</i>	1,7x10 ⁻¹⁰	rs4985155	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>PKDCC</i>	1,3x10 ⁻⁹	rs7584262	ND	ND	Anormalidades esqueléticas, alterações na mineralização óssea e na ossificação	GEFOS2
<i>PTHLH</i>	1,9x10 ⁻¹²	rs7953528	Regulador do desenvolvimento endocondral	Braquidactilia tipo E2, AD	Malformações esqueléticas, alterações na remodelação e microestrutura ósseas, osteoporose	GEFOS2
<i>RPS6KA5</i>	2,0x10 ⁻¹⁵	rs1286083	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>RSPO3</i>	3,0x10 ⁻⁸	rs13204965	Ativação da beta-catenina	ND	SAD	Duncan 2011
<i>RUNX2</i>	5,6x10 ⁻¹¹	rs11755164	Envolvido na diferenciação de Ob e morfogênese esquelética	Displasia cleidocraniana, AD; Displasia metafisária, AD	Malformações esqueléticas, alterações na mineralização e remodelação ósseas, alterações na DMO, esqueleto frágil	GEFOS2

Continua

Tabela 4 – Genes incluídos no painel de sequenciamento a partir de GWAS (*continuação*)

Gene	p para BMD (p para fratura)	SNP	Envolvimento fisiopatologia óssea	Fenótipo em humanos	Modelos animais (fenótipo esquelético observado em camundongos)	Referências
<i>SALL1</i>	$1,9 \times 10^{-22}$	rs1566045	ND	Sd de Townes-Brocks, com malformações de pés e mãos, AD	Malformações em carpo e metacarpo	GEFOS2
<i>SHFM1</i> ¹	$8,1 \times 10^{-48}$ ($5,9 \times 10^{-11}$)	rs4727338	ND	Malformação de pés e mão bipartidos, AD	SAD	GEFOS1, GEFOS2
<i>SMG6</i>	$9,8 \times 10^{-19}$	rs4790881	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>SMOC1</i>	$4,0 \times 10^{-13}$	rs227425	ND	Microftalmia com anormalidades em membros, AR	Malformações esqueléticas	Zhang 2014
<i>SOST</i>	$2,0 \times 10^{-11}$	rs4792909	Antagonista da via Wnt	Esclerosteose / Sd de van Buchem, AR; Displasia craniodiafisária, AD	Alterações na remodelação e microestrutura óssea, aumento da massa e resistência ósseas	Styrkarsdottir 2009, GEFOS2
<i>SOX4</i>	$2,7 \times 10^{-13}$	rs9466056	Possível mediador da sinalização de PTH e PTHrP	ND	SAD	GEFOS2
<i>SOX6</i>	$1,1 \times 10^{-32}$	rs7108738	Participação na condrogênese	ND	Malformação do esterno	Hsu 2010 (56), GEFOS1, GEFOS2
<i>SOX9</i>	$1,9 \times 10^{-11}$	rs7217932	Envolvimento na diferenciação de condrócitos	Displasia campomélica com ou sem reversão de sexo e malformações esqueléticas, AD	Malformações esqueléticas, alterações na mineralização óssea	GEFOS2
<i>SP7</i>	$3,0 \times 10^{-20}$	rs2016266	Fator de transcrição fundamental à diferenciação de Ob	Osteogênese imperfeita, AR	Deformidades esqueléticas, alteração da mineralização e ossificação ósseas	Styrkarsdottir 2009, Timpson 2009 (50), GEFOS1, GEFOS2
<i>SPP1</i>	$1,2 \times 10^{-27}$ ($1,7 \times 10^{-8}$)	rs6532023	Envolvido no acoplamento de Oc à matriz mineralizada	ND	Alterações na remodelação e mineralização ósseas, aumento de DMO e da espessura trabecular	GEFOS2
<i>SPTBN1</i>	$2,3 \times 10^{-18}$ ($2,6 \times 10^{-8}$)	rs4233949	ND	ND	SAD	GEFOS1, GEFOS2
<i>STARD3NL</i>	$3,8 \times 10^{-38}$	rs6959212	ND	ND	SAD	GEFOS1, GEFOS2
<i>SUCO</i>	$8,5 \times 10^{-15}$	rs479336	Fundamental à modelação óssea na embriogênese; regula síntese de colágeno tipo 1	ND	Alteração da morfologia da fibrila de colágeno, alterações na remodelação óssea, baixa DMO	GEFOS2
<i>SUPT3H</i>	$5,6 \times 10^{-11}$	rs11755164	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>TMEM263</i>	$9,6 \times 10^{-10}$	rs1053051	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>TNFRSF11A (RANK)</i>	$1,6 \times 10^{-17}$	rs884205	Receptor de membrana da via RANK-RANKL-OPG, presente nos Oc	Doença de Paget juvenil, AD; Osteopetrose, AR; Osteólise expansiva familiar, AD	Alterações da remodelação, microarquitetura e mineralização ósseas, deformidades esqueléticas, alta DMO	Styrkarsdottir 2009, GEFOS1, GEFOS2
<i>TNFRSF11B (OPG)</i>	$3,2 \times 10^{-39}$	rs2062377	Antagonista da via RANK-RANKL-OPG	Doença de Paget juvenil, AR	Alterações da remodelação e microarquitetura ósseas, deformidades esqueléticas, baixa DMO, esqueleto frágil	Styrkarsdottir 2008, Richards 2008, GEFOS1, GEFOS2

Continua

Tabela 4 – Genes incluídos no painel de sequenciamento a partir de GWAS (*conclusão*)

Gene	p para BMD (p para fratura)	SNP	Envolvimento fisiopatologia óssea	Fenótipo em humanos	Modelos animais (fenótipo esquelético observado em camundongos)	Referências
<i>TNFSF11</i> (<i>RANKL</i>)	4,8x10 ⁻⁶⁸	rs9533090	Agonista da via RANK-RANKL-OPG	Osteopetrose AR	Alterações da remodelação e microarquitetura ósseas, deformidades esqueléticas, alta DMO	Styrkarsdottir 2008 & 2009, GEFOS1, GEFOS2
<i>TTC21B</i>	4,8x10 ⁻¹⁰	rs6710518	ND	Displasia torácica asfixiante, AR; Nefronoftise, AR / AD	Deformidades esqueléticas	Duncan 2011
<i>USF3</i>	4,1x10 ⁻¹⁰	rs1026364	ND	ND	SAD	GEFOS2
<i>WLS</i>	2,6x10 ⁻¹³	rs1430742	Envolvido na ativação da via Wnt	ND	Malformações esqueléticas, atraso da ossificação	GEFOS1, Hsu 2010, Duncan 2011, GEFOS2
<i>WNT16</i>	3,2x10 ⁻⁵¹	rs3801387	Agonista da via Wnt	ND	Menor espessura de osso cortical, menor resistência óssea	GEFOS2, Zheng2012 (62), Zheng 2015 (69)
<i>WNT5B</i>	5,6x10 ⁻¹²	rs2887571	Agonista da via Wnt	ND	Malformações esqueléticas	GEFOS2
<i>XKR9</i>	1,9x10 ⁻⁸	rs7017914	ND	ND	ND	GEFOS2
<i>ZBTB40</i>	7,4x10 ⁻⁵⁷	rs6426749	ND	ND	SAD	Styrkarsdottir 2008, GEFOS1, Duncan 2011, GEFOS2
<i>ZNF408</i>	5,1x10 ⁻¹⁸	rs7932354	ND	Vitreoretinopatia exsudativa, AD; Retinite pigmentosa, AR	SAD	GEFOS1, GEFOS2

É mostrado o nível de significância (*p*) mais expressivo e seu correspondente polimorfismo de um nucleotídeo (single nucleotide polymorphism, *SNP*); Função da proteína de acordo com Entrez Gene e OMIM; Fenótipo humano de acordo com OMIM; Modelos animais de acordo com Mouse Genome Informatics (*MGI*).

¹os genes *C7orf76* e *SHFM1* são atualmente considerados como um único gene denominado *SEM1*. No entanto, constamos nesta lista os genes considerados à época da elaboração do painel e com base na versão *GRCh37* do genoma humano.

AD, autossômica dominante; *AR*, autossômica recessiva; *CMO*, conteúdo mineral ósseo; *DMO*, densidade mineral óssea; *ND*, não disponível; *Ob*, osteoblastos; *Oc*, osteoclastos; *OPG*, osteoprotegerina; *RANK*, Receptor Activator of Nuclear Factor κ B; *RANKL*, ligante de *RANK*; *SAD*, sem alteração óssea descrita em modelos com alteração do gene; *Sd*, síndrome; *XLR*, herança ligada ao X, recessiva

4.2. Pacientes selecionados para o estudo

Foram avaliados para inclusão neste projeto 387 pacientes com osteoporose em acompanhamento no grupo de doenças osteometabólicas (DOM) da Divisão de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no ambulatório de DOM da Endocrinologia do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, ou encaminhados por colegas interessados no estudo do metabolismo ósseo. Aplicando-se os critérios de inclusão e exclusão, 37 indivíduos foram selecionados e submetidos ao SPLE. Vinte e um destes foram considerados casos isolados, e 16 indivíduos faziam parte de 7 famílias, constituindo 28 casos índices de osteoporose grave, familiar ou idiopática. As características clínicas destes pacientes estão resumidas na tabela 5 e na figura 6. Os heredogramas dos casos familiares são apresentados na figura 7.

A coorte incluída teve idade ao diagnóstico de OP variando entre 19 e 81 anos, com mediana de 44 anos. Vinte (54%) são do sexo masculino. Considerando o sítio com pior DMO (coluna lombar, colo de fêmur ou fêmur total), dentre os que tiveram o Z-escore avaliado, a mediana (intervalo) foi $-3,0$ ($-2,1$ a $-5,7$), e para T-escore foi $-3,85$ ($-1,3$ a $-6,1$). Cinco indivíduos (14%) nunca apresentaram nenhum tipo de fratura, sendo que 22 (59%) já tiveram ao menos uma fratura vertebral e 27 (73%) ao menos uma fratura não vertebral.

Figura 6 – Características clínicas da coorte

Tabela 5 – Características clínicas dos pacientes submetidos ao sequenciamento paralelo em larga escala

Id	Sexo	Critério para inclusão	Idade ao dx (anos)	Altura (cm)	IMC (kg/m ²) ¹	DMO - Z/T-escore			Idade 1ª fratura (anos)	Fraturas não vertebrais	Fraturas vertebrais	Outras informações relevantes
						CL	CF	FT				
1	M	OP idiopática	57	170	22,0	T -3,6	-1,2	-0,9	NA	0	0	NDN
2	M	OP grave	77	165	20,9	T -5,5	-4,1	-3,8	19	1 (tornozelo)	3	HAS, DM2, quadro demencial, nefrolitíase sem hipercalcúria, TBG 60 a.m
3	M	OP idiopática	39	172	28,4	Z -4,8	-2,9	ND	6	3 (braço, fíbula, escápula)	0	Ex-TBG, 20 a.m, hipercalcúria
4	F	OP idiopática	33	149→147	30,3	T -4,8	-2,8	ND	33	5 (úmero, pododáctilo, costelas)	5	Fraturas vertebrais no puerpério, nefrolitíase sem hipercalcúria
5	M	OP idiopática	35	174→171	33,0	T -3,5	-2,2	-2,3	8	>10 (membros sup. e inf., mão)	9	Ex-TBG, 10 a.m, nefrolitíase sem hipercalcúria
6	M	OP idiopática	42	173	21,7	Z -2,7	-2,1	-2,0	7	5 (rádio, mão, costelas)	1	NDN
7	F	OP idiopática	35	173	20,1	Z -3,8	-1,4	-1,6	15	4 (mão, pé, ombro, tibia)	0	Nefrolitíase sem hipercalcúria, transtorno depressivo
8	F	OP idiopática	25	161→150	24,7	Z -5,7	-4,3	-4,6	7	8 (cotovelos, antebraços, fêmur, tíbias, clavícula)	9	Fraturas vertebrais durante trabalho de parto, TBG 5 a.m
9	F	OP idiopática	33	159	20,2	Z -2,3	-2,2	-1,9	33	2 (côndilos femurais)	ND	Nefrolitíase sem hipercalcúria
10	M	OP grave e idiopática	58	163→159	22,8	T -4,9	-3,4	-3,5	58	0	5	NDN
11	M	OP idiopática	22	161	29,7	Z -2,1	-0,8	-0,1	22	4 (fêmures e tíbias)	0	Provável diabetes insipidus, hipercalcúria
12	M	OP grave e idiopática	44	167→165	23,4	T -4,6	-3,5	-3,5	55	2 (mandíbula, escafoide)	0	Nefrolitíase sem hipercalcúria, melanoma aos 42 e 51 anos

Continua

Tabela 5 – Características clínicas dos pacientes submetidos ao sequenciamento paralelo em larga escala (*continuação*)

Id	Sexo	Critério para inclusão	Idade ao dx (anos)	Altura (cm)	IMC (kg/m ²) ¹	DMO - Z/T-escore			Idade 1ª fratura (anos)	Fraturas não vertebrais	Fraturas vertebrais	Outras informações relevantes
						CL	CF	FT				
13	F	OP idiopática	38	151→148	22,8	Z -3,5	-1,4	-1,6	33	1 (joelho)	5	Fraturas vertebrais no puerpério
14	M	OP grave e idiopática	64	169→155	23,4	T -6,1	-3,8	-4,1	68	5 (fêmures, escápula)	11	HAS, ex-TBG 20 a.m
15	F	OP idiopática	21	149	20,7	Z -4,4	-4,4	-4,9	1	1 (fêmur)	Múltiplas	NDN
16	F	OP grave	60	145	25,7	T -4,0	ND	ND	60	5 (clavícula, rádio, bacia, tibia, úmero)	4	HAS, DLP
17	F	OP idiopática	22	163	21,5	Z -3,0	-1,5	-1,8	20	7 (tornozelo, pé, mãos, rádio, costelas)	1	NDN
18	M	OP idiopática	26	181	22,9	Z -2,3	-2,6	-2,0	7	3 (rádio, tibia, metatarso)	ND	NDN
19	F	OP grave	49	155→144	20,0	T -5,1	-3,1	-3,3	72	1 (antebraço)	4	HAS, DLP
20	M	OP idiopática	45	163	23,3	T -3,0	-1,1	-1,5	NA	0	0	Nefrolitíase sem hipercalcúria
21	M	OP idiopática	39	169→150	21,6	Z -2,8	-0,5	-2,3	39	1 (pelve)	12	Osteonecrose de cabeça de fêmur aos 43 anos
F1A	M	OP grave e idiopática	53	159	23,1	T -4,5	-4,5	-3,7	2	6 (antebraço bilateral, costelas)	4	DLP
F1B	F	OP familiar	70	153	26,5	T -2,7	-2,5	-1,9	60	2 (joelho, tornozelo)	0	DLP
F2A	M	OP idiopática	52	153	25,2	T -3,6	-3,0	ND	52	0	9	HAS, TBG 100 a.m
F2B	F	OP grave e familiar	49	154	29,1	T -4,0	-2,1	-1,2	NA	0	0	Osteoartrose, DLP

Continua

Tabela 5 – Características clínicas dos pacientes submetidos ao sequenciamento paralelo em larga escala (*conclusão*)

Id	Sexo	Critério para inclusão	Idade ao dx (anos)	Altura (cm)	IMC (kg/m ²) ¹	DMO - Z/T-escore			Idade 1ª fratura (anos)	Fraturas não vertebrais	Fraturas vertebrais	Outras informações relevantes
						CL	CF	FT				
F3A	F	OP idiopática	33	158	24,8	T -3,7	-2,4	ND	33	0	4	Epilepsia desde os 34 anos
F3B	F	OP familiar	56	155	28,3	T -2,4	-1,5	-1,4	56	2 (tornozelos)	1	HAS
F4A	F	OP grave	65	154	26,0	T -4,2	-3,7	-4,3	30	4 (fêmur, pé, costelas)	1	NDN
F4B	F	OP familiar	81	149	36,2	T -1,8	-2,4	-2,7	81	3 (fêmur, rádio, ulna)	ND	Hipoparatiroidismo, ex-TBG 40 a.m
F5A	F	OP grave	65	153→142	23,1	T -4,2	-3,8	ND	84	0	3	DLP
F5B	F	OP familiar	54	168	23,4	T -1,7	-3,0	-3,1	10	2 (antebraço e clavícula)	ND	Ex-TBG, 30 a.m, transtorno psicótico desde os 27 anos, hipertireoidismo aos 48 anos
F6A	M	OP idiopática	35	173	26,2	Z -3,5	-1,9	-2,0	19	3 (úmero, antebraço, costela)	1	NDN
F6B	M	OP familiar	32	165	33,6	Z -2,7	-0,7	-0,2	13	3 (punho, tíbia, dedo)	0	Sd Metabólica
F6C	M	OP familiar	61	163	36,5	T -0,9	-1,3	-0,4	9	4 (punho, cotovelo, antebraço, pé)	1	Ex-TBG 30 a.m
F7A	M	OP idiopática	51	180→176	22,8	T -3,1	-2,9	-2,8	56	0	3	Ex-TBG, 15 a.m, nefrolitíase sem hipercalcúria,
F7B	M	OP familiar	19	172	22,6	Z -2,1	-0,5	-0,9	NA	0	0	NDN
F7C	M	OP familiar	20	174	22,5	Z -3,1	-1,8	-1,6	NA	0	0	NDN

¹IMC calculado com base na maior altura registrada.

a.m, anos-maço; CL, coluna lombar; CF colo de fêmur; DLP, dislipidemia; DM2, diabete melito tipo 2; FT, fêmur total; HAS, hipertensão arterial sistêmica; Id, identificação; IMC, índice de massa corpórea; NA, não se aplica; ND, não disponível; NDN, nada digno de nota; Sd, síndrome; TBG, tabagismo.

Figura 7 – Heredogramas das famílias incluídas no projeto. Os indivíduos submetidos ao SPLE estão identificados conforme a tabela 5. Asteriscos indicam indivíduos incluídos na análise de segregação familiar por Sanger.

4.3. Sequenciamento genético

Para cada indivíduo sequenciado, a cobertura média do SPLE variou entre 306 e 1728 leituras. Em todos os indivíduos, acima de 98% das regiões-alvo tiveram cobertura superior a 50 vezes, conforme demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 – Dados de cobertura do sequenciamento paralelo em larga escala

Id	Cobertura média (número de <i>reads</i>)	Cobertura ≥ 10x (%)	Cobertura ≥ 20x (%)	Cobertura ≥ 50x (%)
1	743	99,85	99,76	99,39
2	1091	99,88	99,81	99,57
3	899	99,88	99,82	99,46
4	573	99,83	99,7	99,21
5	1079	99,93	99,83	99,59
6	532	99,81	99,64	99,01
7	889	99,90	99,80	99,47
8	939	99,92	99,84	99,56
9	386	99,77	99,56	98,70
10	320	99,71	99,38	98,21
11	315	99,76	99,47	98,32
12	321	99,72	99,43	98,50
13	352	99,78	99,49	98,47
14	331	99,74	99,44	99,48
15	437	99,83	99,70	99,07
16	403	99,81	99,62	98,86
17	425	99,82	99,58	99,00
18	347	99,78	99,53	98,56
19	421	99,80	99,53	98,75
20	380	99,76	99,47	98,60
21	391	99,78	99,50	98,68
F1A	868	99,85	99,78	99,40
F1B	1247	99,91	99,84	99,65
F1C	1185	99,91	99,85	99,68
F2A	1728	99,91	99,71	99,74
F2B	617	99,84	99,73	99,20
F3A	607	99,83	99,81	99,25
F3B	1067	99,88	99,75	99,56
F4A	773	99,86	99,87	99,36
F4B	1552	99,94	99,78	99,70
F5A	324	99,80	99,52	98,60
F5B	334	99,80	99,60	98,71
F6A	900	99,87	99,82	99,46
F6B	336	99,78	99,54	98,62
F6C	368	99,77	99,56	98,74
F7A	306	99,73	99,39	98,16
F7B	390	99,79	99,56	98,67
F7C	493	99,87	99,74	99,28

4.3.1. Análise de variantes de ponto e pequenas indels

Foi identificado na coorte analisada um total de 1.835 variantes. Após aplicação dos critérios de priorização de variantes citados no item 3.3.2.1., foram consideradas como variantes de interesse 31 variantes de ponto não sinônimas e 1 deleção de 9 pb, todas confirmadas visualmente no IGV e por sequenciamento pelo método de Sanger. Todas as variantes de interesse se encontram em heterozigose e são apresentadas por caso índice nas tabelas 7 e 8.

4.3.2. Análise de variantes de número de cópias

A análise de CNVs realizada pelo CONTRA e posteriormente por inspeção visual no IGV sugeriu a presença de 3 grandes deleções em heterozigose. Uma delas, que envolvia um éxon de 627 pb, foi excluída pelo método de Sanger. Duas deleções com > 700 pb foram avaliadas por *array* citogenômico, cujo resultado gráfico é apresentado na figura 8. Esse método possibilitou confirmar uma deleção de 41.543 pb, que inclui o único éxon codificador do gene candidato *GPR68* e os éxons 14 a 16 do gene vizinho *DGLUCY*. A segunda deleção pesquisada por *array* citogenômico envolvia os éxons 1 a 14 do gene *PDXDC1*, no entanto houve baixa cobertura do método utilizado para essa região, impossibilitando uma análise conclusiva.

Figura 8 – Análise por *array* citogenômico para confirmação das variantes de número de cópias. Em A e C, a análise realizada pelo CONTRA sugere deleções no gene *GPR68* do indivíduo 6 e no gene *PDXDC1* do indivíduo 11 (destacadas com círculos vermelhos). Em B e D, o resultado do *array* citogenômico, realizado para confirmação das deleções. No indivíduo 6, a deleção é confirmada e engloba o intervalo delimitado pelas linhas horizontais vermelhas, onde se nota, à direita do painel B, perda de heterozigose representada pela ausência de marcadores na coluna central (esta coluna indica a presença de polimorfismos em heterozigose). À esquerda, confirma-se que a perda de heterozigose se deve a uma deleção pelo desvio à esquerda do *Log R Ratio*. No indivíduo 11, o intervalo em que se suspeita haver deleção está delimitado pelas linhas vermelhas no painel D, mostrando apenas uma sonda na região, inferior ao número necessário para análise pelo método utilizado (igual ou superior a 10 sondas)

4.3.3. Características das variantes de interesse identificadas pelo SPLE

No total, foram selecionadas 33 variantes de interesse (tabelas 7 e 8), todas em heterozigose. Foi possível proceder à análise de segregação familiar em 11 casos, correspondendo a 19 das 33 variantes de interesse (58%), conforme exposto nas tabelas 7 e 9. Esta análise favoreceu patogenicidade de 6 variantes de interesse e foi inconclusiva para 8 variantes. Para as demais 5 variantes, a análise de segregação desfavoreceu um papel patogênico relevante.

Excluindo-se as variantes cuja análise de segregação desfavoreceu sua patogenicidade, restaram 28 variantes cuja segregação familiar favoreceu patogenicidade, foi inconclusiva, ou não pôde ser realizada, sendo denominadas a partir de então como variantes potencialmente patogênicas (VPPs). Estas 28 VPPs foram identificadas em 20 casos (71% da coorte). Associações de VPPs em genes diferentes foram identificadas em 6 casos (21%), sendo 3 casos com duas VPPs, 2 casos com três VPPs e 1 caso com quatro VPPs. Duas VPPs (*NOTCH2* p. Leu2408His e *LACTB2* p.144_147del) foram identificadas mais de uma vez em indivíduos não relacionados. Cinco VPPs já foram descritas previamente (Tabela 10)

As 28 VPPs foram identificadas em 23 genes, representando 18% do painel de genes candidatos. Sete VPPs (25%) se encontram em genes previamente associados a casos extremos de OP ou a casos leves de OI, a saber, *COL1A1*, *COL1A2*, *PLS3* e *WNT1*. Dezesseis VPPs (57%) foram identificadas em 14 genes incluídos devido a resultados de GWAS. As demais VPPs se localizam em genes associados a doenças Mendelianas com alto impacto sobre a resistência óssea (*BMPI*, *NOTCH2*, *P3H1*, *PTDSS1*, *PTDSS2*).

Tabela 7 – Variantes de interesse identificadas por SPLE e confirmadas por Sanger ou *array* citogenômico

Id	Gene	Variante		Frequência alélica			Predição in silico ¹			Análise de segregação familiar
		DNA	Proteína	gnomAD	1000gen	ABraOM	SIFT	PP2	CADD	
1	<i>PTDSS1</i>	c.G214A	p.Gly72Ser	0,09%	0,02%	0,16%	D	D	28	ND
2	<i>COLEC10</i>	c.C373T	p.Arg125Trp	0,05%	0,00%	0,00%	D	D	21,8	ND
3	<i>COLIA1</i>	c.G1583A	p.Arg528His	0,02%	0,02%	0,08%	D	D	17,7	Inconclusiva
	<i>WLS</i>	c.A75C	p.Gln25His	0,02%	0,00%	0,08%	D	D	16,25	Inconclusiva
	<i>WNT1</i>	c.G278A	p.Cys93Tyr	0,00%	0,00%	0,00%	D	D	24,7	Favorece patogenicidade
4	<i>AXIN1</i>	c.G931A	p.Ala311Thr	0,00%	0,00%	0,00%	T	D	28,4	ND
	<i>COLIA2</i>	c.G2123A	p.Arg708Gln	0,07%	0,00%	0,16%	D	D	25,1	ND
	<i>FOXC2</i>	c.T1492C	p.Cys498Arg	0,00%	0,04%	0,08%	T	D	15,5	ND
	<i>PTDSS2</i>	c.G748A	p.Val250Met	0,26%	0,12%	0,00%	D	D	22	ND
5	<i>P3H1</i>	c.C1072A	p.Pro358Thr	<0,01%	0,00%	0,00%	D	P	15,24	Inconclusiva
6	<i>GPR68</i>	Deleção exônica		NA	NA	NA	NA	NA	NA	ND
7	<i>NBR1</i>	c.G2276T	p.Gly759Val	0,008%	0,00%	0,00%	D	D	25,8	Inconclusiva
8	<i>NOTCH2</i> ²	c.T7223A	p.Leu2408His	0,21%	0,08%	0,74%	D	D	25,5	Favorece patogenicidade
	<i>PLS3</i>	c.C1807T	p.Leu603Phe	0,00%	0,00%	0,00%	D	D	15,6	Favorece patogenicidade
	<i>WNT1</i>	c.G506A	p.Gly169Asp	<0,01%	0,02%	0,00%	D	D	35	Favorece patogenicidade
9	Nenhuma VPP identificada									
10	<i>CCDC170</i>	c.1351G>A	p.Glu451Lys	0,03%	0,10%	0,00%	D	D	33	ND
11	<i>LACTB2</i> ²	c.431_439del	p.144_147del	0,33%	0,24%	0,57%	NA	NA	NA	ND
	<i>NOTCH2</i> ²	c.T7223A	p.Leu2408His	0,21%	0,08%	0,74%	D	D	25,5	ND
12	<i>PKDCC</i>	c.C630G	p.Asn210Lys	0,00%	0,00%	0,00%	D	D	33	ND
13	<i>PLS3</i>	c.C280T	p.Arg94Cys	0,00%	0,00%	0,20%	D	D	34	ND

Continua

Tabela 7 – Variantes de interesse identificadas por SPLE e confirmadas por Sanger ou *array* citogenômico (*conclusão*)

Id	Gene	Variante		Frequência alélica			Predição in silico ¹			Análise de segregação familiar
		DNA	Proteína	gnomAD	1000gen	ABraOM	SIFT	PP2	CADD	
14	<i>AXIN1</i>	c.C1205T	p.Thr402Met	0,06%	0,06%	0,00%	D	D	25.4	Desfavorece patogenicidade
	<i>LRP5</i>	c.G2072C	p.Trp691Ser	0,00%	0,00%	0,00%	D	D	32	Desfavorece patogenicidade
	<i>SALL1</i>	c.G3751A	p.Glu1251Lys	<0,01%	0,00%	0,00%	D	D	33	Desfavorece patogenicidade
15	Nenhuma VPP identificada									
16	Nenhuma VPP identificada									
17	<i>AXIN1</i>	c.G2047A	p.Val683Met	<0,01%	0,00%	0,00%	T	D	22.7	Inconclusiva
18	Nenhuma VPP identificada									
19	<i>NBR1</i>	c.A119G	p.Asp40Gly	0,00%	0,00%	0,00%	T	D	23.5	Favorece patogenicidade
20	<i>USF3</i>	c.4274C>T	p.Ser1425Leu	0,01%	0,02%	0,00%	D	B	22,3	ND
21	<i>FBN1</i>	c.C994T	p.Arg332Cys	<0,01%	0,00%	0,00%	D	D	28.5	Desfavorece patogenicidade
	<i>LACTB2</i> ²	c.431_439del	p.144_147del	0,33%	0,24%	0,57%	NA	NA	NA	Inconclusiva
F1	<i>DSPP</i>	c.G1550T	p.Ser517Ile	<0,01%	0,00%	0,00%	D	D	4.8	Desfavorece patogenicidade
F2	<i>GALNT3</i>	c.A1040C	p.Lys347Thr	0,00%	0,00%	0,00%	T	B	18.45	ND
	<i>WNT1</i>	c.C1007T	p.Thr336Met	0,09%	0,40%	0,00%	D	D	19.58	ND
F3	<i>BMP1</i>	c.G1112A	p.Arg371His	0,00%	0,34%	0,66%	T	D	26.4	ND
F4	<i>IDUA</i>	c.C246G	p.His82Gln	0,29%	0,12%	0,82%	T	D	9.88	Inconclusiva
	<i>KCNMA1</i>	c.G2438A	p.Arg813Gln	<0,01%	0,00%	0,00%	D	D	26.9	Inconclusiva
F5	<i>ANAPC1</i>	c.G3154A	p.Val1052Met	<0,01%	0,00%	0,00%	D	B	24.1	Favorece patogenicidade
F6	Nenhuma VPP identificada									
F7	Nenhuma VPP identificada									

¹Predições in silico: SIFT e PolyPhen2: B, benigna; D, deletéria; P, possivelmente deletéria; T, tolerada. CADD: predições ≥ 15 são consideradas deletérias.

²Variantes iguais identificadas em indivíduos não relacionados.

1000gen, 1000 Genomes; NA, não se aplica; ND, não disponível; PP2, PolyPhen2; VPP, variante potencialmente patogênica.

Tabela 8 – Coordenadas genômicas e identificação dos transcritos referentes às variantes identificadas

Id	Gene	Identificador do transcrito		Variante		Cr	Coordenada genômica
		Ensembl	RefSeq	DNA	Proteína		
1	<i>PTDSS1</i>	ENST00000517309	NM_014754	c.214G>A	p.Gly72Ser	8	97285561
2	<i>COLEC10</i>	ENST00000332843	NM_006438	c.373C>T	p.Arg125Trp	8	120116065
3	<i>COLIA1</i>	ENST00000225964	NM_000088	c.1583G>A	p.Arg528His	17	48271741
	<i>WLS</i>	ENST00000354777	NM_001002292	c.75A>C	p.Gln25His	1	68697908
	<i>WNT1</i>	ENST00000293549	NM_005430	c.278G>A	p.Cys93Tyr	12	49373424
4	<i>AXIN1</i>	ENST00000262320	NM_003502	c.931G>A	p.Ala311Thr	16	364631
	<i>COLIA2</i>	ENST00000297268	NM_000089	c.2123G>A	p.Arg708Gln	7	94049588
	<i>FOXC2</i>	ENST00000320354	NM_005251	c.1492T>C	p.Cys498Arg	16	86602433
	<i>PTDSS2</i>	ENST00000308020	NM_030783	c.748G>A	p.Val250Met	11	488541
5	<i>P3H1</i>	ENST00000236040	NM_001243246	c.1072C>A	p.Pro358Thr	1	43223462
6	<i>GPR68</i>	ENST00000531499	ND	Deleção exônica		14	91669929_91711471
7	<i>NBR1</i>	ENST00000422280	NM_031858	c.2276G>T	p.Gly759Val	17	41352433
8	<i>NOTCH2</i>	ENST00000256646	NM_024408	c.7223T>A	p.Leu2408His	1	120458122
	<i>PLS3</i>	ENST00000420625	NM_001136025	c.1807C>T	p.Leu603Phe	X	114883795
	<i>WNT1</i>	ENST00000293549	NM_005430	c.506G>A	p.Gly169Asp	12	49374354
10	<i>CCDC170</i>	ENST00000239374	NM_025059	c.1351G>A	p.Glu451Lys	6	151914299
11	<i>LACTB2</i>	ENST00000276590	NM_016027	c.431_439del	p.144_147del	8	71556453_71556461
	<i>NOTCH2</i>	ENST00000256646	NM_024408	c.7223T>A	p.Leu2408His	1	120458122
12	<i>PKDCC</i>	ENST00000294964	NM_138370	c.630C>G	p.Asn210Lys	2	42275969
13	<i>PLS3</i>	ENST00000420625	NM_001136025	c.280C>T	p.Arg94Cys	X	114863552

Continua

Tabela 8. Coordenadas genômicas e identificação dos transcritos referentes às variantes identificadas (*conclusão*)

Id	Gene	Identificador do transcrito		Variante		Cr	Coordenada genômica
		Ensembl	RefSeq	DNA	Proteína		
14	<i>AXIN1</i>	ENST00000262320	NM_003502	c.1205C>T	p.Thr402Met	16	354353
	<i>LRP5</i>	ENST00000294304	NM_002335	c.2072G>C	p.Trp691Ser	11	68174262
	<i>SALL1</i>	ENST00000251020	NM_002968	c.3751G>A	p.Glu1251Lys	16	51171247
17	<i>AXIN1</i>	ENST00000262320	NM_003502	c.2047G>A	p.Val683Met	16	343627
19	<i>NBR1</i>	ENST00000422280	NM_031858	c.119A>G	p.Asp40Gly	17	41329969
20	<i>USF3</i>	ENST00000316407	NM_001009899	c.4274C>T	p.Ser1425Leu	3	113376255
21	<i>FBN1</i>	ENST00000316623	NM_000138	c.994C>T	p.Arg332Cys	15	48813009
	<i>LACTB2</i>	ENST00000276590	NM_016027	c.431_439del	p.144_147del	8	71556453_71556461
F1	<i>DSPP</i>	ENST00000399271	NM_014208	c.1550G>T	p.Ser517Ile	4	88535364
F2	<i>GALNT3</i>	ENST00000392701	NM_004482	c.1040A>C	p.Lys347Thr	2	166615879
	<i>WNT1</i>	ENST00000293549	NM_005430	c.1007C>T	p.Thr336Met	12	49375317
F3	<i>BMP1</i>	ENST00000306385	NM_006129	c.1112G>A	p.Arg371His	8	22049596
F4	<i>IDUA</i>	ENST00000247933	NM_000203	c.246C>G	p.His82Gln	4	981684
	<i>KCNMA1</i>	ENST00000404857	NM_001161353	c.2438G>A	p.Arg813Gln	10	78709120
F5	<i>ANAPC1</i>	ENST00000341068	NM_022662	c.3154G>A	p.Val1052Met	2	112578868

Genoma de referência: GRCh37 (g19). Cr, cromossomo; ND, não disponível.

Tabela 9 – Resultados da análise de segregação familiar

Id do caso índice	Parentesco com o caso índice	Idade à época da DXA (anos)	Z/T-escore da DMO				Histórico de fraturas (fxs)	Causas 2árias de OP	Variante de interesse	Status sobre a variante de interesse
			Z/T	CL	CF	FT				
3	Filha	36	Z	-1,6	-0,9	-1,2	Sem fx		<i>COL1A1</i> p.Arg528His	carreador
									<i>WLS</i> p.Gln25His	carreador
									<i>WNT1</i> p.Cys93Tyr	não carreador
5	Mãe	67	T	-2,8	-2,7	-2,7	Fx espontânea de tíbia; Perda de altura (10 cm) ¹	Pós-menopausa	<i>P3H1</i> p.Pro358Thr	carreador
	Irmã	62	T	-1,0	-1,7	-1,5	Fxs de joelho e mandíbula	Pós-menopausa		carreador
	Filha	17	Z	-2,5	NA	NA	Sem fx	DM1		não carreador
7	Mãe	51	T	-2,9	-1,7	NA	Fx de punho	Pós-menopausa	<i>NBR1</i> p.Gly759Val	não carreador
	Irmã	35	Z	-2,4	-1,2	-1,0	Fx de antebraço			não carreador
	Irmão	35	Z	-0,9	+0,8	+0,2	Fxs de pé e mão			não carreador
8	Mãe	62	T	-4,4	-4,4	-3,8	3 fxs de tíbia, 9 fxs vertebrais	Pós-menopausa	<i>NOTCH2</i> p.Leu2408His	não carreador
									<i>PLS3</i> p.Leu603Phe	carreador
									<i>WNT1</i> p.Gly169Asp	carreador
	Pai	67	T	-2,6	-3,1	-2,2	Fx traumática de clavícula		<i>NOTCH2</i> p.Leu2408His	carreador
									<i>PLS3</i> p.Leu603Phe	não carreador
									<i>WNT1</i> p.Gly169Asp	não carreador
14	Filha	46	Z	-1,6	-0,4	-0,6	Sem fx		<i>AXIN1</i> p.Thr402Met	carreador
									<i>LRP5</i> p.Trp691Ser	carreador
									<i>SALL1</i> p.Glu1251Lys	carreador
	Filha	52	T	-3,1	-2,8	-3,3	3 fxs de tornozelo		<i>AXIN1</i> p.Thr402Met	não carreador
									<i>LRP5</i> p.Trp691Ser	carreador
									<i>SALL1</i> p.Glu1251Lys	não carreador

Continua

Tabela 9 – Resultados da análise de segregação familiar (*conclusão*)

Id do caso índice	Parentesco com o caso índice	Idade à época da DXA (anos)	Z/T-escore da DMO				Histórico de fraturas (fx)	Causas 2árias de OP	Variante de interesse	Status sobre a variante de interesse
			Z/T	CL	CF	FT				
17	Pai	63	T	-2,4	-1,9	-1,8	Fxs de costelas	Pós-menopausa	<i>AXIN1</i> p.Val683Met	carreador
	Mãe	68	T	-0,7	-1,7	-1,2	Sem fx			não carreador
	Irmã	34	Z	-1,9	-1,5	-1,1	Sem fx			carreador
19	Filho	50	T	-3,9	-2,5	-2,4	Sem fx	Fxs traumáticas de antebraço e tornozelo	<i>NBR1</i> p.Asp40Gly	carreador
	Filho	42	Z	-0,6	-0,6	-0,4				não carreador
21	Mãe	79	T	-4,2	-3,3	-3,5	Perda de altura (13,5 cm) ¹	Pós-menopausa	<i>FBN1</i> p.Arg332Cys	não carreador
									<i>LACTB2</i> p.144_147del	não carreador
	Irmão	46	Z	+2,2	+0,2	+0,2	Fx traumática		<i>FBN1</i> p.Arg332Cys	carreador
F1	Ind III.7 ²	36	Z	-0,7	-0,1	-0,3	Sem fx	Retocolite ulcerativa, hipercalcúria idiopática	<i>DSPP</i> p.Ser517Ile	carreador
	Ind III.2 ²	45	Z	-1,1	-2,5	-2,1	2 fxs de antebraço			não carreador
	Ind IV.1 ²	20	Z	-3,9	-2,3	-2,7	7 fxs (cotovelo, antebraço, pé, punhos, dedo, costela)			não carreador
F4	Ind III.8 ²	52	DXA normal				Sem fx	Pós-menopausa	<i>IDUA</i> p.His82Gln	não carreador
									<i>KCNMA1</i> p.Arg813Gln	carreador
	Ind III.5 ²	57	Osteopenia				Fx de fragilidade de antebraço, fxs de costelas	Pós-menopausa	<i>IDUA</i> p.His82Gln	não carreador
F5	Ind III.2 ²	54	T	-4,9	-3,8	-3,0	Fxs de mão e vertebral		<i>ANAPC1</i> p.Val1052Met	carreador

¹Radiografia de coluna para confirmação de fraturas não disponível; ²Indivíduos apresentados nos heredogramas (Figura 7)

Tabela 10 – VPPs previamente descritas

Id	Variante	Informações descritas previamente
3	<i>COL1A1</i> p.Arg528His	ClinVar classifica como provavelmente patogênica para OI
4	<i>COL1A2</i> p.Arg708Gln	Descrita em 3 casos: pai e filha com escoliose/cifose e malformações vertebrais (121); mulher de 78 anos com OP, baixa estatura e fratura atípica de fêmur (122); mulher com OP idiopática e fraturas desde a infância (123). Estudos funcionais <i>in vitro</i> mostraram redução do diâmetro das fibrilas de colágeno (124)
8	<i>WNT1</i> p.Gly169Asp	Descrita em 2 indivíduos chineses portadores de OI moderada devido a heterozigose composta em <i>WNT1</i> (125)
F3	<i>BMP1</i> p.Arg371His	ClinVar classifica como significado indeterminado para OI
F4	<i>IDUA</i> p.His82Gln	Estudos funcionais <i>in vitro</i> em células CHO mostraram redução da atividade proteica (126)

5. Discussão

Metodologias de alta capacidade em análise genética vêm permitindo um grande avanço no conhecimento molecular das doenças. No campo da fragilidade óssea, essa tecnologia vem sendo amplamente utilizada para o estudo da OP comum, através de GWAS, e para a descoberta de novos genes associados a doenças Mendelianas com alto impacto sobre a resistência óssea, como a osteogênese imperfeita. Pesquisas sobre a etiologia molecular de formas idiopáticas ou familiares de OP são menos frequentes na literatura, e na maioria das vezes utilizam como estratégia a pesquisa de um número limitado de genes candidatos. Nesse contexto, este projeto de pesquisa teve como objetivos criar uma lista abrangente de genes candidatos à fragilidade óssea e estudar esses genes em uma coorte de pacientes com OP grave, familiar ou idiopática.

Os critérios de seleção de pacientes utilizados foram bastante restritivos, com o intuito de incluir apenas indivíduos com alta probabilidade de contribuição genética ao quadro de osteoporose. O uso de tais critérios se reflete nas características gerais da coorte selecionada, de forma que a mediana da idade ao diagnóstico (44 anos) é mais precoce do que o esperado para casos de OP comum. As medianas de Z e T-escores (-3,0 e -3,85, respectivamente) e a alta prevalência de fraturas (86% da coorte) também refletem a maior gravidade da condição nos indivíduos dessa coorte. Por outro lado, o uso de critérios muito restritivos pode ter levado à exclusão de casos com potencial etiologia genética.

A investigação familiar ativa realizada no decorrer deste trabalho levou à descoberta de diversos casos familiares relacionados a indivíduos inicialmente considerados como casos isolados. Esse fato é bem representado por um dos filhos da

paciente 19 que, apesar de não ter histórico de fraturas ou outros fatores de risco para OP, apresentou T-escore -3,9 em coluna lombar, aos 50 anos. Em casos familiares isso também foi observado na família 5, em que o indivíduo III.2 (conforme heredograma na figura 7) foi investigado apenas devido ao histórico familiar, tendo sido identificada OP grave, com T-escore -4,9 em coluna lombar e fraturas vertebrais morfométricas. Estes casos reforçam o componente genético da coorte selecionada.

Para a elaboração da lista de genes candidatos, buscaram-se genes associados a todo o espectro de manifestações relacionadas à resistência óssea, resultando em um painel de sequenciamento composto por 128 genes. O resultado do levantamento bibliográfico realizado para seleção deste painel foi publicado e vem sendo utilizado por pesquisadores da área (127). Foram identificadas VPPs em 18% dos genes que compõem o painel, tornando-os bons candidatos para análises futuras. Apesar do grande número de genes incluídos no painel, genes candidatos identificados posteriormente à sua elaboração não puderam ser analisados.

Noventa e cinco genes que compõem o painel foram selecionados a partir de evidências provenientes de GWAS. Destes, 50,5% têm alguma outra evidência de participação no metabolismo ósseo, o que corrobora a relevância dos achados de GWAS, e torna interessante o estudo dos demais genes, em busca de novas vias envolvidas na resistência óssea. Apenas oito dos 128 genes sequenciados já foram descritos em associação a casos extremos de OP, o fenótipo de interesse deste projeto. De fato, na literatura, poucos estudos sobre o componente genético deste fenótipo foram publicados. Nestes, inicialmente recorreu-se à estratégia de análise de um número limitado de genes candidatos, com mudança desta abordagem após o advento do SPLE (73, 88, 89, 113-115, 117-120, 128-132). Muitos destes trabalhos complementaram a

investigação com análise familiar, frequentemente evidenciando segregação familiar incompleta (Tabela 11).

Em especial, o desenho do estudo de Collet et al em 2017 foi semelhante ao empregado neste projeto (123). Em 123 indivíduos com OP idiopática foi realizado o sequenciamento de 14 genes candidatos: *ALPL*, *COL1A1*, *COL1A2*, *DKK1*, *EN1*, *LRP5*, *LRP6*, *PLS3*, *TNFRSF11A*, *TNFRSF11B*, *TNFSF11*, *VDR*, *WNT1*, *WNT16*. Os autores usaram como critérios para seleção de variantes com potencial patogênico a frequência populacional e predições *in silico* feitas por SIFT, PolyPhen e *Mutation Taster*. O trabalho descreve 24 variantes distintas em 27 indivíduos (22% da coorte), sendo a maioria delas (79%) variantes não sinônimas. Chama a atenção o alto número de variantes raras em *LRP5* (13 variantes encontradas em 16 indivíduos), todas elas submetidas a estudo funcional, e a identificação de 2 variantes em *COL1A2* previamente associadas à OI. Uma das pacientes descritas apresentou associação de variantes em genes distintos: *LRP5* p.Asp587Asn e *DKK1* p.Arg120Leu. Neste caso, a análise de segregação familiar mostrou um fenótipo de fragilidade óssea mais leve no pai, portador da variante em *LRP5*, e no irmão, portador da variante em *DKK1*, favorecendo um mecanismo oligogênico na determinação do fenótipo mais grave do caso índice.

Em relação aos achados do estudo aqui apresentado, chama a atenção o alto número de variantes em *LRP5* identificadas por Collet, em comparação a apenas uma variante de interesse na coorte brasileira, posteriormente descartada por análise de segregação familiar. Comparando-se os tipos de variantes identificadas, nas duas coortes a maioria é de ponto – 79% na francesa e 93% na brasileira.

Tabela 11 – Resumo dos estudos previamente publicados sobre variantes genéticas em casos extremos de OP

Estudo	Características da coorte	Tecnologia utilizada	Genes candidatos	Variantes identificadas	Análise de segregação familiar
Spotila, 1991; Spotila, 1994 (113, 114)	26 indivíduos com baixa massa óssea idiopática	Sequenciamento do cDNA a partir de RNAm de fibroblastos,	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>	<i>COL1A2</i> p.Gly661Ser <i>COL1A1</i> p.Pro205Ala	Realizada em 1 caso, com segregação incompleta
Dawson, 1999 (133)	2 irmãos com OIJ	Análise de hibridização de RNA	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i>	<i>COL1A2</i> p.Gly526Arg	Pai carreador da variante não tem fraturas
Hartikka, 2005 (73)	20 crianças com OIJ ¹	CSGE	<i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i> , <i>LRP5</i>	<i>LRP5</i> p.Ala29Thr <i>LRP5</i> p.Arg1036Gln <i>LRP5</i> p.Cys913fs*73	Nos 3 casos, a variante segrega com o fenótipo
Crabbe, 2005 (115)	66 homens com OP idiopática	dHPLC e CSGE	<i>LRP5</i>	<i>LRP5</i> p.Ser356Leu <i>LRP5</i> p.Ser455Leu	Nos 2 casos, variante segrega com o fenótipo
Korvala, 2012 (117)	15 crianças com OIJ ¹	CSGE	<i>AXIN1</i> , <i>DKK1</i> , <i>DKK2</i> , <i>WNT3A</i> , <i>WNT10B</i> , <i>SOST</i> , <i>TPH1</i> , <i>5-HTR1B</i>	<i>DKK1</i> p.Arg120Leu <i>WNT3A</i> p.Lys51Arg	Os 2 casos apresentam segregação incompleta entre variante e fenótipo
van Dijk, 2013 (89)	95 casos de OP ligada ao X	Exoma do cromossomo X em família representativa, sequenciamento por Sanger nas demais	NA	<i>PLS3</i> p.Tyr79Ilefs*6 <i>PLS3</i> p.Gln491* <i>PLS3</i> c.748+1G>A <i>PLS3</i> p.253_254insAsn <i>PLS3</i> p. Ser550Alafs*9	Segregação completa (homens com OP grave de início precoce e mulheres com OP e fraturas após a menopausa)
Laine, 2013 (88)	Família de 4 gerações com OP de herança AD	Escaneamento genômico e SPLE da região com desequilíbrio de ligação	NA	<i>WNT1</i> p.Cys218Gly	Segregação completa
Keupp, 2013 (120)	Família de 4 gerações com OP de herança AD	Sequenciamento exômico	NA	<i>WNT1</i> p.Arg235Trp	Segregação completa, porém 1 indivíduo com a variante é descrito como “jovem demais para apresentar o fenótipo”

Continua

Tabela 11 – Resumo dos estudos previamente publicados sobre variantes genéticas em casos extremos de OP (*continuação*)

Estudo	Características da coorte	Tecnologia utilizada	Genes candidatos	Variantes identificadas	Análise de segregação familiar
Fahiminiya, 2013 (116)	1 caso de OIJ	Sequenciamento exômico	13 genes de OI + <i>LRP5</i>	<i>LRP5</i> p.Cys913fs*73	Segregação incompleta
Cook, 2014 (74)	1 caso de OP associada à gestação	Sequenciamento por Sanger	<i>LRP5</i>	<i>LRP5</i> p.1485_1488del <i>MTHFR</i> 677TT (rs1801133)	Segregação incompleta
Fahiminiya, 2014 (118)	2 famílias com 2 irmãos afetados	Sequenciamento exômico	Genes de OI + <i>PLS3</i>	<i>PLS3</i> p.Asp332* <i>PLS3</i> p.Leu478Pro	Compatível com herança recessiva ligada ao X
Laine, 2015 (119)	Família de 3 gerações com OP ligada ao X	Sequenciamento exômico	NA	<i>PLS3</i> p. c.73-24T>A	Homens hemizigotos com OP grave de início precoce e mulheres heterozigotas com apresentação clínica variável
Franceschi, 2015 (128)	10 crianças com OIJ	dHPLC e CSGE	<i>LRP5</i> , <i>LRP6</i>	Nenhuma	NA
Kannu, 2017 (129)	1 caso de OIJ	Sequenciamento exômico	Genes de OI	<i>PLS3</i> c.1730dupT	Mãe e irmã heterozigotas, sem fraturas. Mãe tem DMO normal (Z-escore -1,3), irmã tem BMOI (Z-escore -3,8)
Kämpe, 2017 (132)	31 casos de OIJ	Sequenciamento por Sanger	<i>PLS3</i>	<i>PLS3</i> p.Arg256* <i>PLS3</i> p.Asn446Ser	Um caso compatível com herança recessiva ligada ao X e um caso compatível com herança dominante ligada ao X
Kämpe, 2017 (131)	2 casos de OIJ	Sequenciamento exômico ou de painel e <i>array</i> citogenômico	Genes de OI + <i>ALPL</i> , <i>PLOD2</i> , <i>PLS3</i> e <i>LRP5</i>	<i>PLS3</i> deleção éxons 4-16; Deleção de 600 kb envolvendo <i>PLS3</i> e <i>AGTR2</i>	Um caso compatível com herança recessiva ligada ao X e um caso compatível com herança dominante ligada ao X

Continua

Tabela 11 – Resumo dos estudos previamente publicados sobre variantes genéticas em casos extremos de OP (*conclusão*)

Estudo	Características da coorte	Tecnologia utilizada	Genes candidatos	Variantes identificadas	Análise de segregação familiar
Lv, 2017 (130)	1 caso de OIJ	Sequenciamento de painel genético, confirmação pelo método de Sanger	13 genes de OI + <i>LRP5</i> e <i>PLS3</i>	<i>PLS3</i> deleção dos éxons 10 a 16	Compatível com herança recessiva ligada ao X
Bardai, 2017 (134)	94 indivíduos com OIJ	Sequenciamento de painel genético, confirmação pelo método de Sanger	17 genes de OI + <i>LRP5</i> , <i>PLS3</i> , <i>ALPL</i> , <i>P4HB</i> , <i>RUNX2</i> , <i>XYLT2</i>	<i>COL1A1</i> : p.Gly338Ser, p.Gly560Cys, c.1876-1G>C, c.1984-5del, p.Arg697*, p.Arg1141*; <i>COL1A2</i> : p. Gly211Val, p.Gly280Ser, p.Gly508Ala, p.Gly532Glu, p.Gly790Ala; <i>LRP5</i> : p.Cys913Leufs*73, p.Arg1036Gln, p.Leu1149Gln, p.Glu1255Serfs*18; <i>BMP1</i> : c.2107G>C + c.*241T>C, c.*241T>C + c.*241T>C; <i>PLS3</i> : p. Asp332*, p.Leu478Pro ²	Não realizada
Collet, 2017 (123)	123 indivíduos com OP idiopática	Sequenciamento de painel genético, confirmação pelo método de Sanger	<i>ALPL</i> , <i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i> , <i>DKK1</i> , <i>EN1</i> , <i>LRP5</i> , <i>LRP6</i> , <i>PLS3</i> , <i>TNFRSF11A</i> , <i>TNFRSF11B</i> , <i>TNFRSF11</i> , <i>VDR</i> , <i>WNT1</i> , <i>WNT16</i> ,	<i>COL1A2</i> : p.Gly193Ser, p.Gly247Cys, p.Arg708Gln, p.Pro471Leu; <i>WNT1</i> : p.Gly36Asp, p.Gly134Arg, p.Asp168Asn, p.Arg182Trp; <i>PLS3</i> : p.Val403Argfs*7, p.Gly626Arg; <i>DKK1</i> : P.Arg120Leu; <i>LRP5</i> : p.Lys265Gln, p.Cys336Gly, p.Met473Thr, c.1413-2A>G, p.Lys772Argfs*26, p.Ala1418Profs, p.Glu1597*, p.Asp587Asn, p.Trp560Cys, p.Glu829Gln, p.Arg1188Gln p.Ala1196Thr, p.Asp1288Gly	Avaliada em 1 caso (descrito no texto)

¹Mesma coorte, com exclusão de 5 casos no estudo de 2012. ²Foram incluídas apenas variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas de acordo com as diretrizes do ACMG-AMP.

AD, autossômica dominante; BMOI, baixa massa óssea para idade; CSGE, eletroforese em gel sensível à conformação; dHPLC, cromatografia líquida desnaturante de alta performance; DMO, densidade mineral óssea; NA, não se aplica; OIJ, osteoporose idiopática juvenil; OP, osteoporose; RNAm, RNA mensageiro; SNP, polimorfismo de um nucleotídeo

A partir das 1835 variantes identificadas por SPLE, a aplicação dos critérios de filtragem e confirmação por metodologias adicionais resultou em 33 variantes de interesse, raras ou ausentes nas bases de dados populacionais e com predição de impacto negativo sobre a função da proteína.

Conforme apresentado previamente, frente à grande quantidade de informação genética adquirida com o SPLE, o principal desafio é identificar, dentre as variantes genéticas encontradas, qual ou quais têm relação causal com o fenótipo de interesse. A diretriz de interpretação de variantes proposta pelo ACMG-AMP vem sendo considerada na literatura como referência para análise de variantes encontradas por SPLE no âmbito clínico. É importante ressaltar que esta diretriz foi estabelecida para o diagnóstico molecular de doenças Mendelianas, com padrão de herança bem definido, causadas, em geral, por variantes ausentes na população geral, com alto impacto sobre a proteína e penetrância completa, em genes com função biológica bem estabelecida (102).

As características inerentes ao fenótipo estudado neste projeto restringem a aplicação dos critérios indicados por essa diretriz. Por se tratar de uma apresentação extrema de uma doença comum, é esperado que as variantes estejam presentes na população geral, apesar de menos frequentes (Figura 5). Posto que o impacto das variantes sobre o fenótipo estudado é menor do que ocorre nas doenças Mendelianas, é razoável deduzir que o impacto sobre a proteína seja também menor, o que explicaria a alta prevalência na nossa coorte de variantes não sinônimas, em detrimento de variantes com mudança no quadro de leitura ou ganho de parada. Por fim, estudos genéticos em osteoporose idiopática são escassos na literatura, e, portanto, muitos genes candidatos ainda têm significado incerto e poucas variantes descritas. De fato, das 33 variantes identificadas na nossa coorte, apenas cinco têm relato prévio de algum tipo de

associação a um fenótipo de acometimento ósseo, sendo apenas uma delas associada previamente à OP idiopática (Tabela 10). Como esperado, a aplicação dos critérios propostos pela ACMG-AMP no estudo aqui apresentado classifica a grande maioria das variantes identificadas como variantes de significado incerto, com exceção das variantes *IDUA* p.His82Gln e *WNT1* p.Gly169Asp, classificadas como provavelmente patogênicas, e *COL1A2* p.Arg708Gln, classificada como patogênica.

Com a intenção de refinar a atribuição de patogenicidade, procedeu-se à análise de segregação familiar em todos os casos em que havia familiares de primeiro grau dispostos a participar da pesquisa. Foi possível analisar a segregação familiar de 19 das 33 variantes de interesse. A análise de segregação foi inconclusiva para oito variantes, principalmente porque a perda de massa óssea e ocorrência de fraturas se manifestam ao longo da vida, de forma que indivíduos mais jovens com o genótipo de risco podem ainda não ter desenvolvido o fenótipo, e indivíduos mais velhos sem o genótipo de risco podem ter osteoporose e fraturas devido a outros fatores de risco, como idade, pós-menopausa, tabagismo etc. Apesar disso, a análise de segregação familiar foi informativa para 11 das 19 variantes investigadas, afastando uma contribuição patogênica significativa de 5 variantes de interesse, e corroborando a hipótese de patogenicidade para 6 variantes (Tabelas 7 e 8). Excluindo-se as 5 variantes com patogenicidade afastada pela segregação familiar, restaram 28 variantes, consideradas a partir de então como variantes potencialmente patogênicas (VPPs). Estratégias para quantificar os resultados da análise de segregação de maneira mais objetiva vêm sendo desenvolvidas (135); entretanto, o emprego destas estratégias depende da definição fenotípica clara dentro de cada família e de penetrância completa, o que, conforme já discutido, restringe sua aplicação neste estudo.

Além da influência de fatores ambientais, interações oligogênicas podem explicar a segregação incompleta observada nesta coorte e em relatos prévios da literatura, o que dificulta a interpretação da análise de segregação familiar. No caso do indivíduo 3, um homem com diagnóstico de BMOI aos 39 anos com Z-escore -4,8 e primeira fratura de fragilidade apenas aos 58 anos, foram identificadas 3 VPPs – *COL1A1* p.Arg528His, *WLS* p.Gln25His e *WNT1* p.Cys93Tyr. Sua filha de 36 anos, saudável, sem fraturas e com Z-escore -1,6 em coluna é portadora de 2 destas VPPs, nos genes *COL1A1* e *WLS*. Este contexto permite diversas interpretações. Ainda que a variante em *WNT1* possa ser a única responsável pelo quadro de OP apresentado pelo caso índice, não pode ser descartada a hipótese de que é a associação de 2 ou das 3 VPPs que determina o fenótipo do pai. Além disso, é possível que a filha, ainda jovem, apresente um fenótipo de fragilidade óssea no futuro, sendo reclassificada como caso ao invés de controle. A variante *COL1A1* p.Arg528His é relatada pelo ClinVar como provavelmente patogênica, dando suporte à teoria de que um papel patogênico desta variante não pode ser descartado com base na análise de segregação desta família.

5.1. Contextualização dos achados moleculares

Vinte e cinco por cento das VPPs identificadas se encontram em genes conhecidamente associados a fenótipos semelhantes de fragilidade óssea: 3 variantes em *WNT1*, 2 em *PLS3*, e 2 nos genes do colágeno tipo 1, *COL1A1* e *COL1A2*. Estas VPPs foram identificadas em 21% da coorte, percentual semelhante ao observado por Bardai et al, que identificaram variantes nos genes *PLS3*, *LRP5*, *COL1A1* e *COL1A2* em 23% de uma coorte de 94 indivíduos com OP idiopática juvenil, e por Collet et al, com 21% de uma coorte de 123 indivíduos com OP idiopática apresentando variantes em *WNT1*, *PLS3*, *LRP5* e *COL1A2* (123, 134). Uma diferença expressiva na comparação com estas

coortes com fenótipo relativamente semelhante é que Bardai et al encontraram variantes classificadas, de acordo com os critérios do ACMG-AMP, como patogênicas ou provavelmente patogênicas em 28% da coorte, Collet et al em 16% da sua coorte, e nós em apenas 11% da coorte. Esta discrepância pode ser explicada pela diferença no perfil dos casos incluídos, em especial no caso da coorte de Bardai et al, que é composta por pacientes mais jovens, com diagnóstico de OP idiopática juvenil.

Duas VPPs foram identificadas em casos não relacionados: *NOTCH2* p.Leu2408His (indivíduos 8 e 11) e *LACTB2* p.144_147del (indivíduos 11 e 21). Ambas são raras nas maiores bases de dados populacionais, com frequência alélica de 0,21% e 0,33% no gnomAD, respectivamente. Na maior base de dados brasileira, o ABraOM, onde a prevalência de OP auto-declarada é 22,9%, as frequências destas variantes são 0,74% e 0,57% respectivamente, contrastando com a prevalência alélica de 3,6% nesta coorte, e sugerindo potencial associação com o fenótipo.

Associação de duas ou mais VPPs em diferentes genes candidatos foi encontrada em uma grande parte da nossa coorte – 21% dos casos. O potencial impacto destas interações genéticas sobre o fenótipo é bem ilustrado pelo caso 8 (Tabelas 5, 7 e 8). Trata-se de uma mulher com antecedente de múltiplas fraturas periféricas entre os 7 e 23 anos – ao total 7 fraturas incluindo antebraços, tíbias, cotovelo e clavícula. Aos 25 anos, durante trabalho de parto, ocorreram 9 fraturas vertebrais e consequente perda de 11 cm de altura. É um quadro de fragilidade óssea que se assemelha ao observado em casos de OI, porém ela não apresentava outros comemorativos para esse diagnóstico, como esclera azulada ou dentinogênese imperfeita. Esta paciente apresentou 3 VPPs, todas em heterozigose: *WNT1* p.Gly169Asp, *PLS3* p.Leu603Phe e *NOTCH2* p.Leu2408His.

Defeitos em heterozigose em *WNT1* já foram associadas à OP familiar, e em homozigose à OI (88, 120). É interessante notar que as variantes identificadas em casos de OI nem sempre levam a um fenótipo de OP nos carreadores heterozigotos (88, 120, 136, 137). A variante *WNT1* p.Gly169Asp identificada na paciente 8 já foi descrita previamente em 2 indivíduos chineses portadores de forma moderada de OI associadas a variantes em *WNT1* em heterozigose composta (125). Este trabalho não descreve o fenótipo dos familiares carreadores.

Variantes em *PLS3* são descritas como causadoras de OP de início precoce em homens hemizigotos, e a maioria das mulheres heterozigotas para as mesmas variantes se apresentam como casos de OP pós-menopausa. São descritos alguns casos mais ostensivos nestas mulheres heterozigotas, como uma paciente descrita por Laine et al com múltiplas fraturas periféricas a partir dos 5 anos de idade e fraturas vertebrais ocorridas no puerpério, história semelhante à observada na paciente 8 (119). As demais mulheres heterozigotas da família descrita por Laine et al apresentaram nenhuma ou uma fratura ao longo da vida, e DMO próxima ao limite inferior da normalidade.

Por fim, *NOTCH2* é um gene associado à síndrome de Hajdu-Cheney (SHC) de herança AD e que, além da OP de início precoce, apresenta fácies típica e acroosteólise, características ausentes na paciente 8. A variante identificada *NOTCH2* p.Leu2408His leva à troca de um aminoácido no éxon 34, que codifica o domínio PEST da proteína *NOTCH2* (Figura 3). É neste mesmo éxon que se encontram as variantes já descritas em associação à SHC, devido à relevância do domínio PEST na modulação da atividade de *NOTCH2* (30). Esta mesma variante foi identificada em outro paciente da nossa coorte, indivíduo 11, também em associação a outra VPP.

A análise de segregação familiar da paciente 8 (Tabela 8) mostrou que a mãe, portadora de OP diagnosticada aos 62 anos com T-escore -4,4 em coluna lombar e colo

de fêmur e múltiplas fraturas de fragilidade a partir dos 45 anos, apresenta 2 das 3 VPPs identificadas no caso índice, a saber *WNT1* p.Gly169Asp e *PLS3* p.Leu603Phe. O pai foi diagnosticado com OP aos 67 anos, com T-escore -3,1 e sem fraturas clínicas, e é carreador da variante *NOTCH2* p.Leu2408His. Esses dados sugerem que a associação destas variantes contribui para a maior gravidade do fenótipo apresentado pela paciente 8, quando comparada com seus pais.

Assim como ocorreu nesta coorte, existem na literatura outros relatos de interações oligogênicas em associação a casos extremos de OP. Cook et al identificaram uma combinação de variantes em *LRP5* e *MTHFR* em uma paciente com fraturas vertebrais relacionadas à gestação (74). Mais recentemente, Collet et al relataram a associação de variantes em *LRP5* e *DKK1* em uma mulher de 25 anos com Z-escore em coluna lombar -4,5 e fraturas desde os 10 anos de idade (123). A análise de segregação familiar neste último caso mostrou que o irmão, portador da variante em *DKK1*, e o pai, carreador da variante em *LRP5*, apresentavam apenas baixa massa óssea, corroborando a hipótese de maior gravidade na presença de associação de variantes.

Apesar da vasta maioria de VPPs identificadas serem não sinônimas, um dos indivíduos da coorte apresenta uma grande deleção, em heterozigose, englobando o único éxon codificador do gene candidato *GPR68*, além dos éxons 14 a 16 do gene vizinho *DGLUCY*. Trata-se de um caso de OP idiopática em homem, com ocorrência de fratura vertebral durante atividade física leve aos 42 anos. Infelizmente não foi possível proceder à análise de segregação familiar neste caso.

O gene *GPR68* foi incluído como gene candidato a partir de achados de GWAS, e camundongos com deficiência deste gene apresentam menor osteoclastogênese, concordante com o resultado de estudos *in vitro* (138) (139). Em humanos, variantes genéticas em homozigose neste gene já foram associados à amelogenese imperfeita,

doença odontológica caracterizada por defeito na mineralização do esmalte dentário (140). Neste estudo, porém, apesar de não haver relatos de fraturas nos indivíduos avaliados, a presença de fragilidade óssea não foi adequadamente investigada.

Surpreendentemente, apesar da alta cobertura obtida no sequenciamento genético, não foi identificada nesta coorte nenhuma VPP no gene *LRP5*, possivelmente o gene mais estudado neste contexto, e com alta prevalência de variantes na coorte descrita por Collet et al, especificamente 13%. Outros pesquisadores, no entanto, também relatam baixa prevalência de variantes patogênicas neste gene, como Franceschi et al que não identificaram variantes em *LRP5* em uma coorte de 10 casos de OP idiopática juvenil no Reino Unido, e Crabbe et al, que identificaram 2 variantes potencialmente patogênicas em *LRP5* em uma coorte belga de 66 homens com OP idiopática, correspondendo a uma prevalência de 3% (115, 128).

Excetuando-se os genes associados à OI de herança AD, 5 VPPs se encontram em genes considerados candidatos devido à sua associação a doenças Mendelianas com alto impacto sobre a resistência óssea. A VPP em *NOTCH2*, cujos defeitos levam à síndrome Hajdu-Cheney, foi discutida previamente.

Duas VPPs foram identificadas em genes relacionados à OI de herança AR: *P3H1* p.Pro358Thr e *BMP1* p.Arg371His. Apesar de, até o momento, apenas *WNT1* ter sido associado a um efeito aditivo, com defeitos em heterozigose levando à OP familiar e em homozigose ocasionando quadros graves de OI, em teoria isso pode ocorrer com outros genes associados à OI de herança AR. Além disso, alguns defeitos em homozigose em *BMP1* já foram associados também a casos leves de fragilidade óssea, denotando a possibilidade de um espectro fenotípico associado a diferentes variantes neste gene (134). BMP1 é uma enzima responsável pela clivagem do C-propeptídeo do colágeno tipo 1, e defeitos em homozigose levam a alterações na estrutura da fibrila do

colágeno que favorecem mineralização anormal porém elevada, cursando clinicamente com fragilidade óssea e DMO normal ou alta (141). Os casos relatados de OI por defeitos em *BMP1* descrevem que os familiares carreadores heterozigotos são normais, porém sem detalhamento sobre histórico de fraturas e DXA (142-147).

P3H1 é responsável pela hidroxilação de prolinas das fibrilas de colágeno tipo 1, com impacto sobre a formação da tripla hélice, além de exercer papel fundamental na formação da estrutura tridimensional do colágeno (141). Defeitos em *P3H1* em homozigose levam à OI e, apesar da escassez de relatos sobre o fenótipo de heterozigotos, estudos *in vitro* mostram, em fibroblastos extraídos de carreadores de variantes patogênicas, expressão de RNA mensageiro e hidroxilação da prolina nas fibrilas de colágeno semelhantes aos controles, sugerindo que defeitos em heterozigose não teriam impacto sobre o fenótipo (148, 149).

Por fim, duas VPPs se localizam nos genes *PTDSS1* e *PTDSS2*, ambos envolvidos na produção de fosfatidil-serina. Variantes com ganho de função em *PTDSS1*, levando à maior produção da fosfatidil-serina já foram associados à síndrome de Lenz-Majewski, que cursa com hiperostose progressiva e generalizada, acometendo crânio, vértebras e diáfises de ossos longos. Pode-se especular que variantes com perda de função nestes genes, como previsto para as VPPs identificadas, levariam a redução da massa óssea.

Das 28 VPPs identificadas, 16 (57%) se encontram em 14 genes incluídos no painel de sequenciamento a partir de resultados de GWAS, porém ainda sem um papel definido na determinação da fragilidade óssea em humanos. Oito destes genes apresentam, além dos GWAS, outra linha de evidência os associando a uma participação na biologia óssea.

AXINI e *WLS* são fatores conhecidamente envolvidos na via Wnt de formação óssea, conforme ilustrado na figura 2 (22). Estudos em camundongos com defeitos nos genes *FOXC2*, *GALNT3*, *GPR68*, *IDUA*, *NBRI*, *PKDCC* ou *WLS* mostraram alterações na remodelação óssea, mineralização ou ossificação (Tabela 4) (150-156).

Em humanos, variantes em *GALNT3* já foram associadas à calcinose tumoral hiperfosfatêmica e à síndrome hiperostose-hiperfosfatemia, defeitos em *GPR68* associados à amelogênese imperfeita, e em *IDUA* à mucopolissacaridose, uma doença de depósito lisossomal que cursa com alterações esqueléticas como trabeculação óssea grosseira e corpos vertebrais displásticos (140, 157-159). É importante ressaltar que os indivíduos desta coorte com VPPs em *GALNT3* apresentaram níveis séricos normais de fósforo e ausência de calcinose tumoral ou hiperostose. Da mesma forma, o indivíduo com deleção em *GPR68* não apresenta alterações dentárias significativas, e as portadoras da VPP em *IDUA* não apresentam outros comemorativos da mucopolissacaridose.

Para os genes *ANAPC1*, *CCDC170*, *COLEC10*, *KCNMA1*, *LACTB2* e *USF3*, os nossos resultados são, conforme pesquisa nas bases de dados citadas nos métodos, a primeira linha de evidência adicional associando-os à fisiopatologia da OP.

Destaca-se o fato de terem sido identificadas 2 VPPs distintas no gene candidato *NBRI* (Tabelas 5, 7 e 8). A paciente 7, uma mulher que teve o diagnóstico de BMOI aos 35 anos, com Z-escore -3,8 em coluna lombar e 4 fraturas não vertebrais ao longo da vida, apresenta a variante *NBRI* p.Gly759Val. A análise de segregação familiar dessa variante foi inconclusiva, pois sua mãe e irmã, com formas mais leves de fragilidade óssea, não apresentam a variante. A paciente 19 teve diagnóstico de OP aos 49 anos, pouco após sua menopausa, com T-escore -5,1, porém só apresentou fraturas de fragilidade a partir dos 72 anos. Neste caso, a análise familiar favoreceu a segregação da

variante com o fenótipo – um dos filhos, portador da VPP, aos 50 anos apresentava T-escore -3,9 em coluna lombar, e o segundo filho, sem a VPP, apresentava como pior Z-escore -0,6 em coluna lombar. Estudos em camundongos com defeitos em *Nbr1* mostram alteração de DMO, alterações na microarquitetura óssea e anormalidades na fisiologia dos osteoclastos e diferenciação de osteoblastos. Em conjunto, estes dados reforçam a participação deste gene na fisiopatologia da OP.

Apesar do sequenciamento de um grande número de genes candidatos, não foi possível chegar a um diagnóstico molecular em 29% da coorte estudada, inclusive em três famílias com múltiplas gerações acometidas, denotando um componente genético proeminente. É possível que, nesses casos, o defeito genético se encontre em genes não incluídos no painel de sequenciamento.

6. Conclusões

- Foi criado um painel de sequenciamento para fragilidade óssea, composto de 128 genes candidatos selecionados a partir de doenças Mendelianas com alto impacto sobre a resistência óssea, fenótipos extremos de osteoporose e estudos de associação em escala genômica;
- Em uma coorte composta por 28 casos de osteoporose grave, familiar ou idiopática, foram identificadas 28 variantes genéticas potencialmente patogênicas, sendo 26 variantes de ponto, uma deleção de 9 pares de base e uma deleção envolvendo o único éxon codificador do gene candidato *GPR68*;
- Variantes potencialmente patogênicas foram identificadas em 71% da coorte, e uma associação de variantes em genes distintos foi observada em 21% dos casos, sugerindo um potencial mecanismo oligogênico.

Implicações

Tendo em vista os resultados aqui obtidos e os resultados de estudos prévios, pode-se especular que a análise dos genes candidatos *WNT1*, *PLS3*, *COL1A1* e *COL1A2* em pacientes portadores de OP grave, familiar ou idiopática possa resultar em um diagnóstico molecular preciso em alguns casos. Este diagnóstico poderá, futuramente, ter impacto sobre a apreciação do risco de fratura, o manejo terapêutico direcionado e o aconselhamento familiar.

A identificação de VPPs em genes previamente associados à osteoporose em humanos apenas por GWAS, como *NBR1* e *GPR68*, torna interessante a pesquisa sobre suas funções como potenciais participantes de novas vias moleculares envolvidas na determinação da resistência óssea.

7. Referências

1. Conference CD. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. 1991. p. 107-10.
2. Harvey N, Dennison E, Cooper C. Osteoporosis: impact on health and economics. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(2):99-105.
3. Pinheiro MM, Ciconelli RM, Martini LA, Ferraz MB. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporos Int*. 2009;20(3):399-408.
4. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int*. 1994;4(6):368-81.
5. Brandao C, Camargos B, Zerbini C, Plapler P, Mendonca L, Albergaria B-H, et al. Posições oficiais 2008 da Sociedade Brasileira de Densitometria Clínica (SBDens). *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008. p. 107-12.
6. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Dawson A, De Laet C, Jonsson B. Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *Osteoporos Int*. 2001;12(12):989-95.
7. Siris ES, Adler R, Bilezikian J, Bolognese M, Dawson-Hughes B, Favus MJ, et al. The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group. *Osteoporos Int*. 2014;25(5):1439-43.
8. van Staa TP, Dennison EM, Leufkens HG, Cooper C. Epidemiology of fractures in England and Wales. *Bone*. 2001;29(6):517-22.
9. Moraes LF, Silva EN, Silva DA, Paula AP. Expenditures on the treatment of osteoporosis in the elderly in Brazil (2008 - 2010): analysis of associated factors. *Rev Bras Epidemiol*. 2014;17(3):719-34.
10. Chrischilles EA, Butler CD, Davis CS, Wallace RB. A model of lifetime osteoporosis impact. *Arch Intern Med*. 1991;151(10):2026-32.
11. Cooper C, Atkinson EJ, Jacobsen SJ, O'Fallon WM, Melton LJ. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol*. 1993;137(9):1001-5.
12. Patrick Ross F. Osteoclast biology and bone resorption. 8th ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*: Wiley-Blackwell; 2013.
13. Bonewald L. Osteocytes. 8th ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*: Wiley-Blackwell; 2013.

14. Baxter-Jones AD, Faulkner RA, Forwood MR, Mirwald RL, Bailey DA. Bone mineral accrual from 8 to 30 years of age: an estimation of peak bone mass. *J Bone Miner Res.* 2011;26(8):1729-39.
15. Heaney RP, Recker RR, Saville PD. Menopausal changes in bone remodeling. *J Lab Clin Med.* 1978;92(6):964-70.
16. Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005;34(4):1015-30, xi.
17. Albright F, Smith P, Richardson A. POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS ITS CLINICAL FEATURES. *JAMA* 1941. p. 2465-74.
18. Sobacchi C, Frattini A, Guerrini MM, Abinun M, Pangrazio A, Susani L, et al. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nat Genet.* 2007;39(8):960-2.
19. Guerrini MM, Sobacchi C, Cassani B, Abinun M, Kilic SS, Pangrazio A, et al. Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. *Am J Hum Genet.* 2008;83(1):64-76.
20. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2009;361(8):756-65.
21. Lewiecki EM. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(11):631-8.
22. Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet.* 2012;13(8):576-88.
23. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paepers BW, Kovacevich BR, Proll S, et al. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet.* 2001;68(3):577-89.
24. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001;107(4):513-23.
25. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med.* 2014;370(5):412-20.
26. Saag KG, Petersen J, Brandi ML, Karaplis AC, Lorentzon M, Thomas T, et al. Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2017;377(15):1417-27.

27. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, et al. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med.* 2016;375(16):1532-43.
28. Zanotti S, Canalis E. Notch signaling in skeletal health and disease. *Eur J Endocrinol.* 2013;168(6):R95-103.
29. Canalis E, Schilling L, Yee SP, Lee SK, Zanotti S. Hajdu Cheney Mouse Mutants Exhibit Osteopenia, Increased Osteoclastogenesis, and Bone Resorption. *J Biol Chem.* 2016;291(4):1538-51.
30. Simpson MA, Irving MD, Asilmaz E, Gray MJ, Dafou D, Elmslie FV, et al. Mutations in NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss. *Nat Genet.* 2011;43(4):303-5.
31. Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, et al. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol.* 2009;5(10):734-42.
32. Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007;357(9):905-16.
33. Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev.* 1993;14(6):690-709.
34. Wan M, Yang C, Li J, Wu X, Yuan H, Ma H, et al. Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes Dev.* 2008;22(21):2968-79.
35. Smith DM, Nance WE, Kang KW, Christian JC, Johnston CC. Genetic factors in determining bone mass. *J Clin Invest.* 1973;52(11):2800-8.
36. Arden NK, Baker J, Hogg C, Baan K, Spector TD. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study of postmenopausal twins. *J Bone Miner Res.* 1996;11(4):530-4.
37. Slemenda CW, Turner CH, Peacock M, Christian JC, Sorbel J, Hui SL, et al. The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density. *Osteoporos Int.* 1996;6(2):178-82.
38. Michaëlsson K, Melhus H, Ferm H, Ahlbom A, Pedersen NL. Genetic liability to fractures in the elderly. *Arch Intern Med.* 2005;165(16):1825-30.
39. Andrew T, Antoniadou L, Scurrah KJ, Macgregor AJ, Spector TD. Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD. *J Bone Miner Res.* 2005;20(1):67-74.
40. Bonfá AC, Seguro LP, Caparbo V, Bonfá E, Pereira RM. RANKL and OPG gene polymorphisms: associations with vertebral fractures and bone mineral density in premenopausal systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int.* 2015;26(5):1563-71.

41. Heilberg IP, Hernandez E, Alonzo E, Valera R, Ferreira LG, Gomes SA, et al. Estrogen receptor (ER) gene polymorphism may predict the bone mineral density response to raloxifene in postmenopausal women on chronic hemodialysis. *Ren Fail.* 2005;27(2):155-61.
42. Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM, Karasik D. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet.* 2007;8 Suppl 1:S14.
43. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet.* 2008;371(9623):1505-12.
44. Stykarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med.* 2008;358(22):2355-65.
45. Yang TL, Chen XD, Guo Y, Lei SF, Wang JT, Zhou Q, et al. Genome-wide copy-number-variation study identified a susceptibility gene, UGT2B17, for osteoporosis. *Am J Hum Genet.* 2008;83(6):663-74.
46. Liu YZ, Wilson SG, Wang L, Liu XG, Guo YF, Li J, et al. Identification of PLCL1 gene for hip bone size variation in females in a genome-wide association study. *PLoS One.* 2008;3(9):e3160.
47. Rivadeneira F, Stykarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2009;41(11):1199-206.
48. Stykarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet.* 2009;41(1):15-7.
49. Thorleifsson G, Holm H, Edvardsson V, Walters GB, Stykarsdottir U, Gudbjartsson DF, et al. Sequence variants in the CLDN14 gene associate with kidney stones and bone mineral density. *Nat Genet.* 2009;41(8):926-30.
50. Timpson NJ, Tobias JH, Richards JB, Soranzo N, Duncan EL, Sims AM, et al. Common variants in the region around Osterix are associated with bone mineral density and growth in childhood. *Hum Mol Genet.* 2009;18(8):1510-7.
51. Xiong DH, Liu XG, Guo YF, Tan LJ, Wang L, Sha BY, et al. Genome-wide association and follow-up replication studies identified ADAMTS18 and TGFBR3 as bone mass candidate genes in different ethnic groups. *Am J Hum Genet.* 2009;84(3):388-98.

52. Cho YS, Go MJ, Kim YJ, Heo JY, Oh JH, Ban HJ, et al. A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits. *Nat Genet.* 2009;41(5):527-34.
53. Liu YZ, Pei YF, Liu JF, Yang F, Guo Y, Zhang L, et al. Powerful bivariate genome-wide association analyses suggest the SOX6 gene influencing both obesity and osteoporosis phenotypes in males. *PLoS One.* 2009;4(8):e6827.
54. Guo Y, Tan LJ, Lei SF, Yang TL, Chen XD, Zhang F, et al. Genome-wide association study identifies ALDH7A1 as a novel susceptibility gene for osteoporosis. *PLoS Genet.* 2010;6(1):e1000806.
55. Guo Y, Zhang LS, Yang TL, Tian Q, Xiong DH, Pei YF, et al. IL21R and PTH may underlie variation of femoral neck bone mineral density as revealed by a genome-wide association study. *J Bone Miner Res.* 2010;25(5):1042-8.
56. Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Farber CR, Demissie S, Soranzo N, et al. An integration of genome-wide association study and gene expression profiling to prioritize the discovery of novel susceptibility Loci for osteoporosis-related traits. *PLoS Genet.* 2010;6(6):e1000977.
57. Koller DL, Ichikawa S, Lai D, Padgett LR, Doheny KF, Pugh E, et al. Genome-wide association study of bone mineral density in premenopausal European-American women and replication in African-American women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1802-9.
58. Kung AW, Xiao SM, Cherny S, Li GH, Gao Y, Tso G, et al. Association of JAG1 with bone mineral density and osteoporotic fractures: a genome-wide association study and follow-up replication studies. *Am J Hum Genet.* 2010;86(2):229-39.
59. Duncan EL, Danoy P, Kemp JP, Leo PJ, McCloskey E, Nicholson GC, et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet.* 2011;7(4):e1001372.
60. Zhang YP, Liu YZ, Guo Y, Liu XG, Xu XH, Guo YF, et al. Pathway-based association analyses identified TRAIL pathway for osteoporotic fractures. *PLoS One.* 2011;6(7):e21835.
61. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012;44(5):491-501.
62. Zheng HF, Tobias JH, Duncan E, Evans DM, Eriksson J, Paternoster L, et al. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genet.* 2012;8(7):e1002745.

63. Hwang JY, Lee SH, Go MJ, Kim BJ, Kou I, Ikegawa S, et al. Meta-analysis identifies a MECOM gene as a novel predisposing factor of osteoporotic fracture. *J Med Genet.* 2013;50(4):212-9.
64. Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Sulem P, Gudbjartsson DF, Sigurdsson A, Jonasdottir A, et al. Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits. *Nature.* 2013;497(7450):517-20.
65. Oei L, Hsu YH, Styrkarsdottir U, Eussen BH, de Klein A, Peters MJ, et al. A genome-wide copy number association study of osteoporotic fractures points to the 6p25.1 locus. *J Med Genet.* 2014;51(2):122-31.
66. Zhang L, Choi HJ, Estrada K, Leo PJ, Li J, Pei YF, et al. Multistage genome-wide association meta-analyses identified two new loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet.* 2014;23(7):1923-33.
67. Tan LJ, Wang ZE, Wu KH, Chen XD, Zhu H, Lu S, et al. Bivariate Genome-Wide Association Study Implicates ATP6V1G1 as a Novel Pleiotropic Locus Underlying Osteoporosis and Age at Menarche. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(11):E1457-66.
68. Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, Forgetta V, Warrington NM, Youten SE, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat Genet.* 2017;49(10):1468-75.
69. Zheng HF, Forgetta V, Hsu YH, Estrada K, Rosello-Diez A, Leo PJ, et al. Whole-genome sequencing identifies EN1 as a determinant of bone density and fracture. *Nature.* 2015;526(7571):112-7.
70. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461(7265):747-53.
71. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.* 2008;9(5):356-69.
72. Balemans W, Van Hul W. Identification of the disease-causing gene in sclerosteosis--discovery of a novel bone anabolic target? *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(2):139-42.
73. Hartikka H, Mäkitie O, Männikkö M, Doria AS, Daneman A, Cole WG, et al. Heterozygous mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with primary osteoporosis in children. *J Bone Miner Res.* 2005;20(5):783-9.
74. Cook FJ, Mumm S, Whyte MP, Wenkert D. Pregnancy-associated osteoporosis with a heterozygous deactivating LDL receptor-related protein 5 (LRP5) mutation and a homozygous methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism. *J Bone Miner Res.* 2014;29(4):922-8.

75. Campos-Obando N, Oei L, Hoefsloot LH, Kiewiet RM, Klaver CC, Simon ME, et al. Osteoporotic vertebral fractures during pregnancy: be aware of a potential underlying genetic cause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(4):1107-11.
76. Balemans W, Van Hul W. The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes. *Endocrinology.* 2007;148(6):2622-9.
77. Goodarzi MO. Genetics of Common Endocrine Disease: The Present and the Future. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(3):787-94.
78. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, et al. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet.* 2017;101(1):5-22.
79. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 2007;316(5826):889-94.
80. Lauria F, Siani A, Bammann K, Foraita R, Huybrechts I, Iacoviello L, et al. Prospective analysis of the association of a common variant of FTO (rs9939609) with adiposity in children: results of the IDEFICS study. *PLoS One.* 2012;7(11):e48876.
81. Claussnitzer M, Dankel SN, Kim KH, Quon G, Meuleman W, Haugen C, et al. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N Engl J Med.* 2015;373(10):895-907.
82. Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, et al. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature.* 2014;507(7492):371-5.
83. Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Koroleva I, Bruin G, et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med.* 2010;2(52):52ra72.
84. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CE, Papp K, et al. Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N Engl J Med.* 2014;371(4):326-38.
85. Gottlieb AB, Langley RG, Philipp S, Sigurgeirsson B, Blauvelt A, Martin R, et al. Secukinumab Improves Physical Function in Subjects With Plaque Psoriasis and Psoriatic Arthritis: Results from Two Randomized, Phase 3 Trials. *J Drugs Dermatol.* 2015;14(8):821-33.
86. Baeten D, Baraliakos X, Braun J, Sieper J, Emery P, van der Heijde D, et al. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2013;382(9906):1705-13.

87. Wessel J, Chu AY, Willems SM, Wang S, Yaghootkar H, Brody JA, et al. Low-frequency and rare exome chip variants associate with fasting glucose and type 2 diabetes susceptibility. *Nat Commun.* 2015;6:5897.
88. Laine CM, Joeng KS, Campeau PM, Kiviranta R, Tarkkonen K, Grover M, et al. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med.* 2013;368(19):1809-16.
89. van Dijk FS, Zillikens MC, Micha D, Riessland M, Marcelis CL, de Die-Smulders CE, et al. PLS3 mutations in X-linked osteoporosis with fractures. *N Engl J Med.* 2013;369(16):1529-36.
90. Wesseling-Perry K, Mäkitie RE, Välimäki VV, Laine T, Laine CM, Välimäki MJ, et al. Osteocyte Protein Expression Is Altered in Low-Turnover Osteoporosis Caused by Mutations in WNT1 and PLS3. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(7):2340-8.
91. Jiménez C, Cote G, Arnold A, Gagel RF. Review: Should patients with apparently sporadic pheochromocytomas or paragangliomas be screened for hereditary syndromes? *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):2851-8.
92. Fishbein L, Merrill S, Fraker DL, Cohen DL, Nathanson KL. Inherited mutations in pheochromocytoma and paraganglioma: why all patients should be offered genetic testing. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(5):1444-50.
93. Baim S, Binkley N, Bilezikian JP, Kendler DL, Hans DB, Lewiecki EM, et al. Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Position Development Conference. *J Clin Densitom.* 2008;11(1):75-91.
94. Hans DB, Shepherd JA, Schwartz EN, Reid DM, Blake GM, Fordham JN, et al. Peripheral dual-energy X-ray absorptiometry in the management of osteoporosis: the 2007 ISCD Official Positions. *J Clin Densitom.* 2008;11(1):188-206.
95. Khosla S. Pathogenesis of Osteoporosis. *Transl Endocrinol Metab.* 2010;1(1):55-86.
96. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res.* 1993;8(9):1137-48.
97. Pereira R, Correa PH, Ferraz-de-Souza B, Martin R. Osteoporose. 2nd ed. Clínica Médica: Manole; 2015.
98. Ferraz-de-Souza B, Martin R, Correa PH. Doenças osteometabólicas. 3rd ed. Tratado de Clínica Médica: Editora Guanabara Koogan Ltda; 2016.
99. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.
100. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-91.

101. Eilbeck K, Quinlan A, Yandell M. Settling the score: variant prioritization and Mendelian disease. *Nat Rev Genet.* 2017;18(10):599-612.
102. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
103. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat.* 2017;38(7):751-63.
104. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-81.
105. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;Chapter 7:Unit7.20.
106. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* 2014;46(3):310-5.
107. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D789-98.
108. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D862-8.
109. Krawczak M, Ball EV, Fenton I, Stenson PD, Abeyasinghe S, Thomas N, et al. Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. *Hum Mutat.* 2000;15(1):45-51.
110. Li J, Lupat R, Amarasinghe KC, Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, et al. CONTRA: copy number analysis for targeted resequencing. *Bioinformatics.* 2012;28(10):1307-13.
111. Kelley BP, Malfait F, Bonafe L, Baldridge D, Homan E, Symoens S, et al. Mutations in FKBP10 cause recessive osteogenesis imperfecta and Bruck syndrome. *J Bone Miner Res.* 2011;26(3):666-72.
112. Garbes L, Kim K, Rieß A, Hoyer-Kuhn H, Beleggia F, Bevot A, et al. Mutations in SEC24D, encoding a component of the COPII machinery, cause a syndromic form of osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet.* 2015;96(3):432-9.
113. Spotila LD, Constantinou CD, Sereda L, Ganguly A, Riggs BL, Prockop DJ. Mutation in a gene for type I procollagen (COL1A2) in a woman with postmenopausal

- osteoporosis: evidence for phenotypic and genotypic overlap with mild osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(12):5423-7.
114. Spotila LD, Colige A, Sereda L, Constantinou-Deltas CD, Whyte MP, Riggs BL, et al. Mutation analysis of coding sequences for type I procollagen in individuals with low bone density. *J Bone Miner Res*. 1994;9(6):923-32.
 115. Crabbe P, Balemans W, Willaert A, van Pottelbergh I, Cleiren E, Coucke PJ, et al. Missense mutations in LRP5 are not a common cause of idiopathic osteoporosis in adult men. *J Bone Miner Res*. 2005;20(11):1951-9.
 116. Fahiminiya S, Majewski J, Roughley P, Roschger P, Klaushofer K, Rauch F. Whole-exome sequencing reveals a heterozygous LRP5 mutation in a 6-year-old boy with vertebral compression fractures and low trabecular bone density. *Bone*. 2013;57(1):41-6.
 117. Korvala J, Löija M, Mäkitie O, Sochett E, Jüppner H, Schnabel D, et al. Rare variations in WNT3A and DKK1 may predispose carriers to primary osteoporosis. *Eur J Med Genet*. 2012;55(10):515-9.
 118. Fahiminiya S, Majewski J, Al-Jallad H, Moffatt P, Mort J, Glorieux FH, et al. Osteoporosis caused by mutations in PLS3: clinical and bone tissue characteristics. *J Bone Miner Res*. 2014;29(8):1805-14.
 119. Laine CM, Wessman M, Toiviainen-Salo S, Kaunisto MA, Mäyränpää MK, Laine T, et al. A novel splice mutation in PLS3 causes X-linked early onset low-turnover osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2015;30(3):510-8.
 120. Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O, et al. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet*. 2013;92(4):565-74.
 121. Phillips CL, Shrago-Howe AW, Pinnell SR, Wenstrup RJ. A substitution at a non-glycine position in the triple-helical domain of pro alpha 2(I) collagen chains present in an individual with a variant of the Marfan syndrome. *J Clin Invest*. 1990;86(5):1723-8.
 122. Funck-Brentano T, Ostertag A, Debiais F, Fardellone P, Collet C, Mornet E, et al. Identification of a p.Arg708Gln variant in COL1A2 in atypical femoral fractures. *Joint Bone Spine*. 2017;84(6):715-8.
 123. Collet C, Ostertag A, Ricquebourg M, Delecourt M, Tueur G, Isidor B, et al. Primary Osteoporosis in Young Adults: Genetic Basis and Identification of Novel Variants in Causal Genes. *JBMR Plus*. 2017.
 124. Vomund AN, Braddock SR, Krause GF, Phillips CL. Potential modifier role of the R618Q variant of proalpha2(I)collagen in type I collagen fibrillogenesis: in vitro assembly analysis. *Mol Genet Metab*. 2004;82(2):144-53.

125. Liu Y, Song L, Ma D, Lv F, Xu X, Wang J, et al. Genotype-phenotype analysis of a rare type of osteogenesis imperfecta in four Chinese families with WNT1 mutations. *Clin Chim Acta*. 2016;461:172-80.
126. Yogalingam G, Guo XH, Muller VJ, Brooks DA, Clements PR, Kakkis ED, et al. Identification and molecular characterization of alpha-L-iduronidase mutations present in mucopolysaccharidosis type I patients undergoing enzyme replacement therapy. *Hum Mutat*. 2004;24(3):199-207.
127. Vogiatzi MG, Li D, Tian L, Garifallou JP, Kim CE, Hakonarson H, et al. A novel dominant COL11A1 mutation in a child with Stickler syndrome type II is associated with recurrent fractures. *Osteoporos Int*. 2018;29(1):247-51.
128. Franceschi R, Vincenzi M, Camilot M, Antoniazzi F, Freemont AJ, Adams JE, et al. Idiopathic Juvenile Osteoporosis: Clinical Experience from a Single Centre and Screening of LRP5 and LRP6 Genes. *Calcif Tissue Int*. 2015;96(6):575-9.
129. Kannu P, Mahjoub A, Babul-Hirji R, Carter MT, Harrington J. PLS3 Mutations in X-Linked Osteoporosis: Clinical and Bone Characteristics of Two Novel Mutations. *Horm Res Paediatr*. 2017;88(3-4):298-304.
130. Lv F, Ma M, Liu W, Xu X, Song Y, Li L, et al. A novel large fragment deletion in PLS3 causes rare X-linked early-onset osteoporosis and response to zoledronic acid. *Osteoporos Int*. 2017;28(9):2691-700.
131. Kämpe AJ, Costantini A, Levy-Shraga Y, Zeitlin L, Roschger P, Taylan F, et al. PLS3 Deletions Lead to Severe Spinal Osteoporosis and Disturbed Bone Matrix Mineralization. *J Bone Miner Res*. 2017;32(12):2394-404.
132. Kämpe AJ, Costantini A, Mäkitie RE, Jäntti N, Valta H, Mäyränpää M, et al. PLS3 sequencing in childhood-onset primary osteoporosis identifies two novel disease-causing variants. *Osteoporos Int*. 2017;28(10):3023-32.
133. Dawson PA, Kelly TE, Marini JC. Extension of phenotype associated with structural mutations in type I collagen: siblings with juvenile osteoporosis have an alpha2(I)Gly436 --> Arg substitution. *J Bone Miner Res*. 1999;14(3):449-55.
134. Bardai G, Ward LM, Trejo P, Moffatt P, Glorieux FH, Rauch F. Molecular diagnosis in children with fractures but no extraskeletal signs of osteogenesis imperfecta. *Osteoporos Int*. 2017;28(7):2095-101.
135. Jarvik GP, Browning BL. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1077-81.
136. Pyott SM, Tran TT, Leistritz DF, Pepin MG, Mendelsohn NJ, Temme RT, et al. WNT1 mutations in families affected by moderately severe and progressive recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 2013;92(4):590-7.

137. Palomo T, Al-Jallad H, Moffatt P, Glorieux FH, Lentle B, Roschger P, et al. Skeletal characteristics associated with homozygous and heterozygous WNT1 mutations. *Bone*. 2014;67:63-70.
138. Li H, Wang D, Singh LS, Berk M, Tan H, Zhao Z, et al. Abnormalities in osteoclastogenesis and decreased tumorigenesis in mice deficient for ovarian cancer G protein-coupled receptor 1. *PLoS One*. 2009;4(5):e5705.
139. Yang M, Mailhot G, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Odgren PR. Expression of and role for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) during osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2006;281(33):23598-605.
140. Parry DA, Smith CE, El-Sayed W, Poulter JA, Shore RC, Logan CV, et al. Mutations in the pH-Sensing G-protein-Coupled Receptor GPR68 Cause Amelogenesis Imperfecta. *Am J Hum Genet*. 2016;99(4):984-90.
141. Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe A, et al. Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17052.
142. Martínez-Glez V, Valencia M, Caparrós-Martín JA, Aglan M, Temtamy S, Tenorio J, et al. Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat*. 2012;33(2):343-50.
143. Fahiminiya S, Al-Jallad H, Majewski J, Palomo T, Moffatt P, Roschger P, et al. A polyadenylation site variant causes transcript-specific BMP1 deficiency and frequent fractures in children. *Hum Mol Genet*. 2015;24(2):516-24.
144. Valencia M, Caparrós-Martin JA, Sirerol-Piquer MS, García-Verdugo JM, Martínez-Glez V, Lapunzina P, et al. Report of a newly indentified patient with mutations in BMP1 and underlying pathogenetic aspects. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(5):1143-50.
145. Asharani PV, Keupp K, Semler O, Wang W, Li Y, Thiele H, et al. Attenuated BMP1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish. *Am J Hum Genet*. 2012;90(4):661-74.
146. Cho SY, Asharani PV, Kim OH, Iida A, Miyake N, Matsumoto N, et al. Identification and in vivo functional characterization of novel compound heterozygous BMP1 variants in osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat*. 2015;36(2):191-5.
147. Sangsin A, Kuptanon C, Srichomthong C, Pongpanich M, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Two novel compound heterozygous BMP1 mutations in a patient with osteogenesis imperfecta: a case report. *BMC Med Genet*. 2017;18(1):25.
148. Cabral WA, Chang W, Barnes AM, Weis M, Scott MA, Leikin S, et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat Genet*. 2007;39(3):359-65.

149. Willaert A, Malfait F, Symoens S, Gevaert K, Kayserili H, Megarbane A, et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. *J Med Genet.* 2009;46(4):233-41.
150. Blake JA, Eppig JT, Kadin JA, Richardson JE, Smith CL, Bult CJ, et al. Mouse Genome Database (MGD)-2017: community knowledge resource for the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D723-D9.
151. Park SJ, Gadi J, Cho KW, Kim KJ, Kim SH, Jung HS, et al. The forkhead transcription factor Foxc2 promotes osteoblastogenesis via up-regulation of integrin β 1 expression. *Bone.* 2011;49(3):428-38.
152. Ichikawa S, Austin AM, Gray AK, Allen MR, Econs MJ. Dietary phosphate restriction normalizes biochemical and skeletal abnormalities in a murine model of tumoral calcinosis. *Endocrinology.* 2011;152(12):4504-13.
153. Krieger NS, Yao Z, Kyker-Snowman K, Kim MH, Boyce BF, Bushinsky DA. Increased bone density in mice lacking the proton receptor OGR1. *Kidney Int.* 2016;89(3):565-73.
154. Kuehn SC, Koehne T, Cornils K, Markmann S, Riedel C, Pestka JM, et al. Impaired bone remodeling and its correction by combination therapy in a mouse model of mucopolysaccharidosis-I. *Hum Mol Genet.* 2015;24(24):7075-86.
155. Whitehouse CA, Waters S, Marchbank K, Horner A, McGowan NW, Jovanovic JV, et al. Neighbor of Brca1 gene (Nbr1) functions as a negative regulator of postnatal osteoblastic bone formation and p38 MAPK activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(29):12913-8.
156. Zhong Z, Zylstra-Diegel CR, Schumacher CA, Baker JJ, Carpenter AC, Rao S, et al. Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(33):E2197-204.
157. Frishberg Y, Topaz O, Bergman R, Behar D, Fisher D, Gordon D, et al. Identification of a recurrent mutation in GALNT3 demonstrates that hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome and familial tumoral calcinosis are allelic disorders. *J Mol Med (Berl).* 2005;83(1):33-8.
158. Topaz O, Shurman DL, Bergman R, Indelman M, Ratajczak P, Mizrachi M, et al. Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis. *Nat Genet.* 2004;36(6):579-81.
159. Bunge S, Kleijer WJ, Steglich C, Beck M, Schwinger E, Gal A. Mucopolysaccharidosis type I: identification of 13 novel mutations of the alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mutat.* 1995;6(1):91-4.

Apêndice

1. Aprovação do Projeto de Pesquisa “Diagnóstico Molecular das Doenças do Metabolismo Ósseo”, conforme analisada pela CAPPesq HCFMUSP em 07/06/2013 (Registro: 10666).

2. Artigo de revisão publicado no *Archives of Endocrinology and Metabolism*.

PROJETO DE PESQUISA

Título: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS DOENÇAS DO METABOLISMO ÓSSEO

Pesquisador Responsável: Bruno Ferraz de Souza

Versão: 1

Pesquisador Executante: Bruno Ferraz de Souza

CAAE: 15963413.9.0000.0068

Co-autores: Regina Matsunaga Martin, Adriana Martins Fernandes, Manuela Giuliani
Marcondes Rocha Braz

Instituição: HCFMUSP

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 10666

Número do Parecer: 294.142

Data da Relatoria: 05/06/2013

Apresentação do Projeto: Trata-se de estudo da análise de sequência de DNA e comparação a bases de dados populacionais para o diagnóstico molecular de doenças do metabolismo ósseo. O diagnóstico molecular será feito a partir de amostra de DNA proveniente de leucócitos de sangue periférico ou raspado bucal, envolvendo amplificação gênica, sequenciamento direto e métodos de sequenciamento de nova geração. A identificação do diagnóstico molecular nestes pacientes contribuirá para ampliar a compreensão fisiopatológica e clínica, e para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas no futuro. Serão incluídos 150 pacientes em acompanhamento nos ambulatórios do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HCFMUSP com diagnóstico de osteoporose, osteopenia, osteogênese imperfeita, hiperparatireoidismo, displasia fibrosa, osteomalácia, raquitismo, hipoparatiroidismo, doença de Paget e outras possíveis doenças osteometabólicas. Também serão estudados 150 familiares dos pacientes para estudo de segregação genética das variantes por ventura encontradas e 100 indivíduos controle sadios pareados para idade e cor de pele. Serão avaliados um total de 400 participantes neste estudo.

Objetivo da Pesquisa: Estabelecer o diagnóstico molecular de pacientes com doenças osteometabólicas em acompanhamento nos ambulatórios do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Nenhum benefício direto ou imediato para os participantes do estudo. Este estudo visa identificar potenciais alterações genéticas relacionadas à doença óssea de seu familiar que permitam ampliar o conhecimento científico sobre esta doença e, eventualmente, gerar novas propostas de tratamento no futuro. Há risco mínimo relacionado à punção de veia de antebraço para coleta de amostra de sangue periférico a partir do qual será obtido DNA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo é inovador e relevante pois permitirá o reconhecimento das bases genética e molecular das principais doenças

osteometabólicas. Os resultados auxiliarão o melhor entendimento no mecanismo destas doenças, o desenvolvimento de novos tratamentos e compreensão da herança familiar. Haverá financiamento estimado em 100.000,00 reais oriundos da FAPESP (ainda não obtidos) para a realização da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os autores apresentam três TCLEs: paciente com diagnóstico de doença do metabolismo ósseo, familiares e controles sadios. Os TCLEs são claros, bem redigidos e de fácil compreensão. Os autores informam aos participantes da pesquisa, familiares e controles sadios que no caso de sobra de material, este poderá ser utilizado em novas pesquisas.

Recomendações: Os autores informam sobre o possível armazenamento de material biológico: sangue e esfregado bucal para novas pesquisas futuras, devendo utilizar o TCLE adequado para esta notificação ao participante da pesquisa, no caso de pesquisas futuras.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aprovado

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 07 de Junho de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Genetics of osteoporosis: searching for candidate genes for bone fragility

Manuela G. M. Rocha-Braz^{1,2}, Bruno Ferraz-de-Souza¹

ABSTRACT

The pathogenesis of osteoporosis, a common disease with great morbidity and mortality, comprises environmental and genetic factors. As with other complex disorders, the genetic basis of osteoporosis has been difficult to identify. Nevertheless, several approaches have been undertaken in the past decades in order to identify candidate genes for bone fragility, including the study of rare monogenic syndromes with striking bone phenotypes (*e.g.* osteogenesis imperfecta and osteopetroses), the analysis of individuals or families with extreme osteoporotic phenotypes (*e.g.* idiopathic juvenile and pregnancy-related osteoporosis), and, chiefly, genome-wide association studies (GWAS) in large populations. Altogether, these efforts have greatly increased the understanding of molecular mechanisms behind bone remodelling, which has rapidly translated into the development of novel therapeutic strategies, exemplified by the tales of cathepsin K (*CTSK*) and sclerostin (*SOST*). Additional biological evidence of involvement in bone physiology still lacks for several candidate genes arisen from GWAS, opening an opportunity for the discovery of new mechanisms regulating bone strength, particularly with the advent of high-throughput genomic technologies. In this review, candidate genes for bone fragility will be presented in comprehensive tables and discussed with regard to how their association with osteoporosis emerged, highlighting key players such as *LRP5*, *WNT1* and *PLS3*. Current limitations in our understanding of the genetic contribution to osteoporosis, such as yet unidentified genetic modifiers, may be overcome in the near future with better genotypic and phenotypic characterisation of large populations and the detailed study of candidate genes in informative individuals with marked phenotype. Arch Endocrinol Metab. 2016;60(4):391-401

Keywords

GWAS; mutation; fracture; low bone mass; bone remodeling

¹ Divisão de Endocrinologia e Laboratório de Investigação Médica 18 (LIM-18), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brasil
² Endocrinologia, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSp), São Paulo, SP, Brasil

Correspondence to:

Bruno Ferraz-de-Souza
 Av. Dr. Arnaldo, 455,
 sala 3324 (LIM-18)
 01246-903 – São Paulo, SP, Brasil
 bruno.ferraz@hc.fm.usp.br

Received on Apr/29/2016

Accepted on May/4/2016

DOI: 10.1590/2359-399700000178

INTRODUCTION

Osteoporosis is a common disease characterized by low bone mineral density (BMD) and microarchitectural deterioration, leading to increased fracture risk with great morbidity and mortality, resulting in social and economic burden (1,2). Clinical diagnosis of osteoporosis is established by assessing BMD by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA), a predictor of fracture risk, or by the occurrence of fragility fractures (3,4).

Osteoporosis is a complex disorder, influenced by both environmental and genetic factors. In the study of complex disorders, the genetic influence can be inferred from estimations of heritability, *i.e.*, the portion of phenotypic variance attributable to cumulative genetic factors (5). In osteoporosis, BMD heritability has been estimated from 50 to 85% and, more variably, fracture heritability has ranged from 25 to 68% (6,7). Supporting the intuitive concept that the genetic

influence should be more pronounced in cases of early or idiopathic osteoporosis, fracture heritability is higher for fractures occurring before 70 years of age (8).

The identification of human genes associated with bone fragility started around the 1990s through the study of monogenic syndromes with marked skeletal phenotypes such as osteogenesis imperfecta due to *COL1A1* and *COL1A2* defects (9) and osteopetrosis due to *TCIRG1* defects (10). In 2001, the breakthrough discovery of the involvement of the Wnt signalling pathway on the regulation of bone remodelling was made possible by the study of rare conditions such as osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG) due to *LRP5* mutations (11) and sclerosteosis due to *SOST* defects (12,13). More recently, the study of subjects with extreme phenotypes of osteoporosis, such as idiopathic juvenile osteoporosis and pregnancy-associated osteoporosis has yielded *WNT1* and *PLS3* as novel regulators of bone strength (14-16).

The advent of genome-wide association studies (GWAS) expanded the horizon of the genetic contribution to osteoporosis. Following a proof of concept study in 2007 (17), two pioneer GWAS for BMD were published in 2008 (18,19), identifying five significant loci associated with BMD, four of them near genes already known or suspected to be involved in the pathophysiology of osteoporosis (*RANKL*, *OPG*, *ESR1*, *LRP5*). Highlighting the potential of GWAS for gene discovery, the remaining locus mapped to novel candidate gene *ZBTB40*, later confirmed by subsequent analyses (20). Since then, more than twenty GWAS have been performed interrogating genetic association to BMD, quantitative ultrasound and/or fracture, implicating more than 90 candidate genes for osteoporosis. The function of some of these genes in bone metabolism was only recognized following their identification by GWAS (for example, *AXIN1* and *WLS*), but for the majority of candidates a biological mechanism remains unknown (7).

The identification of molecular pathways in osteoporosis has important implications not only for the recognition of individuals in risk, aiming for a personalized medical approach, but also for the development of new therapeutic strategies, as exemplified by the advent of sclerostin inhibition as a potential treatment for osteoporosis roughly ten years after the identification of *SOST* defects (21). Considering the fast paced evolution in the field, it

is important to gather genetic factors involved with osteoporosis from multiple experimental sources and revise them in light of their contribution to our pathophysiological insight. In this review, a thorough and up-to-date list of candidate genes for bone fragility will be presented and discussed according to how they emerged: from rare monogenic diseases with high impact on bone strength, from extreme phenotypes of osteoporosis and/or from GWAS.

LITERATURE SEARCH STRATEGY

In order to identify genes associated with bone fragility, a broad literature search strategy was devised (Figure 1). A systematic review of original and review articles indexed on PubMed published until October 2015 using the descriptors “osteoporosis”, “genes”, “genetics”, and “bone mass” was undertaken. To retrieve all GWAS on bone fragility, search queries “GWAS and osteoporosis”, “GWAS and fractures”, “GWAS and bone fragility”, and “GWAS and BMD” were used. To enhance our discovery of monogenic disorders associated with altered bone mass or strength, the Online Mendelian Inheritance in Man® (OMIM®) database was also searched using standard descriptors. Mouse phenotypic data for identified candidate genes were obtained from the Mouse Genome Informatics (MGI) online database, and gene function information was searched on NCBI’s Entrez Gene database.

Figure 1. Scheme of the literature search strategy devised in order to identify candidate genes for bone fragility from rare monogenic phenotypes, extreme nonsyndromic cases of osteoporosis and genome wide association studies (GWAS) with bone fragility endpoints.

CANDIDATE GENES EMERGING FROM RARE MONOGENIC DISORDERS

The study of monogenic diseases with high impact on bone strength has enabled the identification of several pivotal mechanisms involved in bone physiology (22). For example, osteogenesis imperfecta has shown the importance of bone collagen matrix quality; Van Buchem disease, Hajdu-Cheney syndrome and autosomal recessive osteopetrosis have revealed

important signalling pathways (namely Wnt, Notch and RANK-RANKL-OPG) that regulate bone remodelling; and pycnodysostosis has given insight into the pivotal action of cathepsin K in osteoclast function. On par with a recently proposed taxonomy of rare genetic disorders of bone metabolism (22), monogenic diseases will be presented according to how they affect bone strength. Candidate genes for bone fragility arising from these disorders are presented in Table 1.

Table 1. Genes associated with rare monogenic diseases with high impact on bone mass/strength

Gene	OMIM id	Protein function	Disease	Phenotype
<i>COL1A1</i>	120150	Type 1 collagen	Osteogenesis imperfecta	Low BMD and increased fracture risk; severity varies from perinatal lethality to asymptomatic; extra-skeletal features include blue sclerae, dentinogenesis imperfecta and hearing loss
<i>COL1A2</i>	120160	Type 1 collagen		
<i>BMP1</i>	112264	C-propeptide cleavage		
<i>CRTAP</i>	605497	Collagen hydroxylation		
<i>FKBP10</i>	607063	Collagen processing		
<i>IFITM5</i>	614757	Mineralization		
<i>P3H1</i>	610339	Collagen hydroxylation		
<i>PLS3</i>	300131	Actin-binding		
<i>PPIB</i>	123841	Collagen hydroxylation		
<i>SEC24D</i>	607186	ER procollagen processing		
<i>SERPINF1</i>	172860	Collagen chaperoning		
<i>SERPINH1</i>	600943	Mineralization		
<i>SP7</i>	606633	Ob regulation		
<i>TMEM38B</i>	611236	Cation channel		
<i>WNT1</i>	164820	Ob activation/Wnt signalling (ligand)		
<i>SEC24D</i>	607186	ER procollagen processing	Cole-carpenter syndrome	Bone fragility; craniosynostosis; ocular proptosis; hydrocephalus; distinctive facial features
<i>P4HB</i>	176790	ER procollagen processing		
<i>FKBP10</i>	607063	Collagen processing	Bruck syndrome	Congenital contractures; early onset of fractures; short stature; severe limb deformity; progressive scoliosis
<i>PLOD2</i>	601865	ER procollagen processing		
<i>TCIRG1</i>	604592	Oc function	Osteopetrosis	High BMD; skeletal deformities; compression of noble structures and occupation of bone marrow space; variable severity and age of onset
<i>CLCN7</i>	602727	Oc function		
<i>OSTM1</i>	607649	Oc homeostasis		
<i>PLEKHM1</i>	611466	Oc function		
<i>CA2</i>	611492	Oc function		
<i>SNX10</i>	614780	Oc homeostasis		
<i>TNFRSF11A</i>	603499	Oc activation (RANK)		
<i>TNFSF11</i>	602642	Oc activation (RANKL)		
<i>CTSK</i>	601105	Oc function		
<i>SOST</i>	605740	Ob activation/Wnt signalling (antagonist)	Sclerosteosis, van Buchem disease	High BMD; increased bone strength; increased head circumference; compression of noble structures; enlarged mandible; syndactyly; high stature
<i>LRP5</i>	603506	Ob activation/Wnt signalling (receptor)	High bone mass syndrome	High BMD; increased bone strength; widened mandible; torus palatinus
			Osteoporosis-pseudoglioma	Early-onset osteoporosis; ocular pseudoglioma or vitreoretinopathy
<i>NOTCH2</i>	600275	Notch signalling	Hajdu-Cheney syndrome	Osteoporosis; short stature; acroosteolysis; distinctive facial features

Proven or proposed protein functions are shown. Ob: osteoblast; Oc: osteoclast; OMIM id: online Mendelian inheritance in man identifier; ER: endoplasmic reticulum; RANK: receptor activator of nuclear factor kappa- β ; RANKL: RANK ligand.

Monogenic diseases affecting the bone matrix

Osteogenesis imperfecta (OI) is a systemic disease characterized by high incidence of low-trauma fractures since birth or childhood due to defects in the bone matrix, chiefly in the quantity or quality of type I collagen (23,24). Clinical presentation is highly heterogeneous, with severity ranging from perinatal lethality to mostly asymptomatic. Extraskelatal features, such as blue sclerae, defective tooth development and hearing loss as well as family history may be present, allowing for an easier diagnosis. When none of these features are present, diagnosing OI can be challenging due to the overlap with idiopathic osteoporosis. Most commonly, OI is an autosomal dominant condition caused by mutations in *COL1A1* and *COL1A2* leading to clinical forms I to IV (25). Type V OI has recently been shown to be caused by mutations in *IFITM5*, also transmitted in an autosomal dominant pattern; the exact role of *IFITM5* in determining bone strength remains elusive (26,27). Several rarer forms of OI with autosomal recessive inheritance exist, and the list of candidate genes for such phenotypes is ever increasing (Table 1). Most genes associated with recessive OI are directly or indirectly involved with type I collagen modification and/or assembly, but for some a mechanism is still unknown (28). Collectively, OI demonstrates how defects in bone material properties may have a substantial impact on bone strength.

More than 400 genetic skeletal disorders have been described, with around 360 genes implicated (29). A number of these skeletal dysplasias may also lead to bone fragility. In particular, Bruck syndrome and Cole-Carpenter syndrome have marked fragility, and their heterogeneous genetic bases overlap with OI (Table 1). Bruck syndrome, characterised by congenital joint contractures and early onset of fractures, can be caused by mutations in *FKBP10* or *PLOD2*, and Cole-Carpenter syndrome, characterised by bone fragility, craniosynostosis and distinctive facies, has been associated with *P4HB* and *SEC24D* defects. Mutations in *FKBP10* and *SEC24D* have also been implicated in OI, meaning that variants with variable biological impact may have different phenotypic expression and lead to isolated bone fragility (30,31).

Monogenic diseases affecting bone remodelling

Impairment of osteoclast-mediated bone resorption is known to lead to high bone mass syndromes such as

osteopetrosis and pycnodysostosis (Table 1). In spite of the high bone mass, a high fracture risk is usually observed due to impaired bone renewal leading to poor quality.

Osteopetrosis is characterized by skeletal deformities, nerve compression and bone marrow occupation, and may present with variable degree of severity and inheritance patterns. Defects in the RANK-RANKL-OPG pathway, pivotal to osteoclast differentiation and activation, lead to autosomal recessive osteopetrosis due to a reduced number of osteoclasts (32). In contrast, defects in several genes involved in osteoclast function may lead to osteopetrosis with a normal or high number of osteoclasts. Of note, mutations in *CLCN7*, *CA2* and *TCIRG1*, disrupting the regulation of organelle pH and acid secretion, may cause osteopetrosis by affecting the osteoclast ability to dissolve the bone matrix (32).

Pycnodysostosis, marked by high bone mass, short stature, skull deformities and acroosteolysis, is caused by mutations in *CTSK* encoding cathepsin K, an enzyme secreted by osteoclasts and crucial to bone resorption (33). The identification of *CTSK* defects as the cause of pycnodysostosis in 1996, and subsequent studies of its function in bone resorption, has led to the development of cathepsin K inhibition as a promising therapeutic approach for osteoporosis 20 years later, highlighting the importance of recognising molecular mechanisms in order to advance medical care and the fast pace of translation in this burgeoning field (34).

Disruption in bone formation may lead to either low BMD, and consequently decreased bone strength, or may inversely cause abnormally high BMD, with stronger bone and possibly decreased risk of fracture. Defects in members of the Wnt signalling pathway, key to osteoblast activation and function, illustrate how these opposite phenotypes might ensue (35). Activation of the Wnt receptor *LRP5* ultimately leads to increased beta-catenin and osteoblast activity. Inactivating mutations in *LRP5* lead to osteoporosis-pseudoglioma syndrome, characterized by severe early-onset osteoporosis and ocular malformation, whereas gain-of-function *LRP5* mutations (which abolish interaction with inhibitors Dkk-1 and sclerostin) lead to the high bone mass syndrome endosteal hyperostosis (Worth disease) (11,36). Accordingly, loss of the bone-specific Wnt inhibitor sclerostin (*SOST*) due to inactivating *SOST* mutations or deletion of its regulatory region lead to sclerosteosis and Van Buchem disease, marked by high

BMD with skeletal deformities such as jaw and cranial enlargement (12,13,37). The painstaking study of these rare disorders led to recognition of sclerostin's crucial repressive role in bone formation; its inhibition is currently being investigated in the treatment of osteoporosis in randomised clinical trials and may represent a paradigm shift in osteoporosis care in the near future (21).

Finally, Hajdu-Cheney syndrome, a rare form of syndromic osteoporosis accompanied by coarse and dysmorphic facies, short stature and acroosteolysis, is caused by *NOTCH2* mutations disrupting Notch signalling (38,39). While the molecular physiology of Notch signalling in bone is still incompletely understood, the pronounced bone fragility in Hajdu-Cheney syndrome underlines the opportunity for novel therapeutic strategies targeting this pathway.

It should be noted that genetic defects associated with osteomalacia, primarily relating to bone mineralization, may also lead to osteoporosis-like milder phenotypes characterized by fragility fractures; within this vast group of disorders, attention is currently drawn to heterozygous *ALPL* mutations leading to adult hypophosphatasia, which has been proposed to be a potentially under-recognised cause of bone fragility (40).

CANDIDATE GENES IDENTIFIED THROUGH EXTREME CASES OF OSTEOPOROSIS

The quest for the genetic basis of a few extreme cases of nonsyndromic idiopathic osteoporosis has been reported in the literature. In general, a candidate gene approach has been applied, focussing on genes associated with OI and, more recently, Wnt signalling.

Even though most studies have involved small cohorts and somewhat limited genetic approaches, the advent of massively parallel sequencing is rapidly boosting our capability for establishing a molecular diagnosis in these cases. Candidate genes identified in this manner are assembled in Table 2.

Initially, well known OI genes *COL1A1* and *COL1A2* posed as conspicuous candidates for mutational analysis in individuals with bone fragility. In 1991, Spotila and cols. investigated a 52-yo postmenopausal woman with low bone mass and a vertebral fracture, identifying a *COL1A2* mutation (41). Of note, this patient had mildly blue sclerae and mild hearing loss, suggesting a mild presentation of OI. In 1994, the same group of authors undertook a mutational analysis of *COL1A1* and *COL1A2* in a cohort of 26 individuals with low bone density, identifying other two mutations in *COL1A1* in association with milder phenotypes (42).

As novel molecular mechanisms in bone fragility were recognised, further genes became candidates for investigation. In 2005 and 2012, Hartikka and cols. and Korvala and cols. reported the mutational analysis of a cohort of children with idiopathic osteoporosis, examining a total of 11 candidate genes mainly associated with autosomal dominant OI or the Wnt signalling pathway (43,44). Initially, Hartikka and cols. studied *COL1A1*, *COL1A2* and *LRP5*, identifying three distinct mutations in *LRP5* in 3 children, with some evidence of familial segregation (43). Later, Korvala and cols. studied 8 new candidate genes, and identified rare sequence variants in two children (44). In one subject they found a heterozygous missense variant in *WNT3A*, which was also present in an affected sister,

Table 2. Genes associated with idiopathic osteoporosis

Gene	OMIM id	Function	Phenotype	Study design	Reference
<i>LRP5</i>	603506	Wnt signalling (receptor)	Juvenile osteoporosis	Candidate gene analysis (3 genes)	(43)
			Vertebral fractures during pregnancy	Candidate gene analysis (3 genes)	(46)
			Postpartum vertebral fractures	Candidate gene analysis (2 genes)	(47)
			Idiopathic juvenile osteoporosis	WES, analysis focussed on candidate genes (14 genes)	(45)
<i>DKK1</i>	605189	Wnt signalling (antagonist)	Juvenile osteoporosis	Candidate gene analysis (8 genes)	(44)
<i>WNT3A</i>	606359	Wnt signalling (ligand)	Juvenile osteoporosis	Candidate gene analysis (8 genes)	(44)
<i>MTHFR</i>	607093	Homocysteine metabolism	Postpartum vertebral fractures	Candidate gene analysis (2 genes)	(47)
<i>PLS3</i>	300131	Actin-binding protein	X-linked osteoporosis	Massively parallel sequencing strategies	(16,48,49)
<i>WNT1</i>	164820	Wnt signalling (ligand)	Early-onset autosomal dominant osteoporosis	Massively parallel sequencing strategies	(14,15)

OMIM id: online Mendelian inheritance in men identifier; WES: whole-exome sequencing.

inherited from their mother who presented with postmenopausal osteoporosis. Nonetheless, the paternal family, who did not carry this variant, had a prominent history of adult osteoporosis and fractures, suggesting that other genetic factors might also be associated with the more severe/early-onset phenotype. In the other subject, a rare variant in *DKKI*, a well-known inhibitor of Wnt signalling, was identified, albeit with incomplete segregation (44).

Further studies have associated *LRP5* variants with an array of extreme osteoporosis phenotypes (Table 2). Also using a candidate gene approach, Fahiminiya and cols., Campos-Obando and cols., and Cook and cols. have studied single cases and found three different *LRP5* variants in two women with pregnancy-related osteoporosis and vertebral fractures, and one boy with idiopathic juvenile osteoporosis (45-47). Segregation analyses did not show clear relationships between variants and phenotype, again suggesting the association of additional genetic and/or environmental factors. One of the subjects with pregnancy-related osteoporosis was also homozygous for the *MTHFR* gene C677T polymorphism, which has been associated with several health outcomes including fracture risk and low BMD (47). *MTHFR* encodes for methylenetetrahydrofolate reductase, an enzyme involved in folate, homocysteine and amino acid metabolism.

The emergence of high throughput technologies allowed *de novo* discovery of candidate genes associated with familial idiopathic osteoporosis. In 2013, two groups independently identified *WNT1* mutations in this context. Keupp and cols. performed whole exome sequencing in a four-generation family with early-onset autosomal dominant osteoporosis, identifying a heterozygous *WNT1* mutation segregating with the phenotype (14). Laine and cols reported the genomewide linkage analysis followed by targeted parallel sequencing of another family with a similar presentation, also leading to the identification of a heterozygous *WNT1* mutation (15). Notably, both groups found homozygous *WNT1* mutations in families with severe recessive OI, suggesting a phenotypic spectrum of severity in relation to the molecular defects. Even though other Wnt family members were already well-known regulators of bone remodelling, these reports unravelled the importance of *WNT1* in bone strength.

The discovery of entirely novel mechanisms in bone fragility has also been made possible by massively parallel

sequencing. In 2013, Van Dijk and cols. performed X-linked whole exome sequencing in a family with X-linked osteoporosis, identifying a deleterious frameshift mutation in *PLS3*, a new factor in bone metabolism (16). Four additional *PLS3* mutations were found in further four families. Notably, male individuals in these families carrying hemizygous *PLS3* variants presented with overt osteoporotic fractures while female carriers had milder phenotypes with low bone mass. Additionally, a rare *PLS3* variant (rs140121121) was found in 5 unrelated males with osteoporotic fractures and then studied in a large Dutch cohort, showing an association with increased fracture risk in elderly heterozygous female carriers, thus suggesting a role for this variant in common osteoporosis (16).

Further reports have supported a causative role for *PLS3* mutations in the genesis of X-linked osteoporosis (48,49). While the biological role of *PLS3* in bone is still largely unknown, a disturbance in osteocyte mechanosensing has been proposed as a putative mechanism based on animal model observations (16).

Taken together, these reports support a robust genetic contribution for extreme cases of osteoporosis, with potential translational implications for the care of common osteoporosis. Nevertheless, the individual impact of these variants on phenotype is still incompletely understood, and additional genetic factors may account for variable phenotypic expression in some cases.

CANDIDATE GENES IDENTIFIED THROUGH GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES (GWAS)

As with other multifactorial diseases, common osteoporosis has long been hypothesized to be caused by multiple common variants each exerting a small influence on phenotype (7). Therefore, the technological breakthrough of GWAS was wholly embraced in the field, and at least twenty-nine low BMD and/or fractures GWAS have been published since 2008, including original studies and meta-analyses. As a result, most of the genes associated with bone fragility until now have been identified through such studies, totalling more than 70 loci and, respectively, more than 90 genes, which are listed on Table 3.

The first two major GWAS were published in 2008 by Stykarsdottir and cols. and Richards and cols, interrogating genetic association to low BMD and low trauma fractures (18,19). Whole sample sizes

Table 3. Genes associated with bone mineral density or fracture risk in major genome-wide association studies

Candidate gene	BMD p-value (Fracture p-value)	SNP	References
<i>ABCF2</i>	7.3×10^{-9}	rs7812088	GEFOS2 [Ref. (20)]
<i>ABL1*</i>	3.4×10^{-22}	rs7851693	GEFOS2
<i>ADAMTS18</i>	2.1×10^{-8}	rs16945612	Xiong 2009 [Ref. (54)]
<i>ALDH7A1</i>	6.4×10^{-6} (2.1×10^{-9})	rs13182402	Guo 2010 [Ref. (55)]
<i>ANAPC1</i>	1.5×10^{-9}	rs17040773	GEFOS2
<i>ARHGAP1</i>	5.1×10^{-18}	rs7932354	GEFOS1 [Ref. (51)], GEFOS2
<i>ATP6V1G1</i>	3.0×10^{-9}	rs10817638	Tan 2015 [Ref. (56)]
<i>AXIN1*</i>	1.0×10^{-16}	rs9921222	GEFOS2
<i>C12orf23</i>	9.6×10^{-10}	rs1053051	GEFOS2
<i>C7orf76</i>	8.1×10^{-48} (5.9×10^{-11})	rs4727338	GEFOS1, GEFOS2
<i>CCDC170</i>	4.0×10^{-35}	rs4869742	GEFOS1, GEFOS2, Styrkarsdottir 2008 [Ref. (19)] & 2009 [Ref. (50)]
<i>CDC5L</i>	5.6×10^{-11}	rs163879	GEFOS2
<i>CLCN7*</i>	1.5×10^{-16}	rs163879	GEFOS2
<i>CLDN14</i>	4.2×10^{-9}	rs170183	Zhang 2014 [Ref. (57)]
<i>COLEC10</i>	3.2×10^{-39}	rs2062377	GEFOS1, GEFOS2, Styrkarsdottir 2008, Richards 2008 [Ref. (18)]
<i>CPED1</i>	6.0×10^{-11}	rs13245690	GEFOS2, Zheng 2012 [Ref. (58)] & 2015 [Ref. (53)]
<i>CPN1</i>	9.0×10^{-10}	rs7084921	GEFOS2
<i>CREB3L1*</i>	5.1×10^{-18}	rs7932354	GEFOS1, GEFOS2
<i>CRHR1</i>	1.4×10^{-8}	rs9303521	GEFOS1
<i>CTNBN1*</i>	4.4×10^{-25}	rs430727	GEFOS1, GEFOS2
<i>CYLD</i>	1.9×10^{-22}	rs1566045	GEFOS2
<i>DCDC1</i>	2.2×10^{-11}	rs163879	GEFOS1, GEFOS2
<i>DCDC5</i>	2.2×10^{-11}	rs163879	GEFOS1, GEFOS2
<i>DHH</i>	1.2×10^{-15}	rs12821008	GEFOS2
<i>DKK1*</i>	1.6×10^{-12} (9.0×10^{-9})	rs1373004	GEFOS2
<i>DMP1*</i>	1.2×10^{-27} (1.7×10^{-9})	rs6532023	GEFOS2, Duncan 2011 [Ref. (52)]
<i>DNM3</i>	8.5×10^{-15}	rs479336	GEFOS2
<i>EN1*</i>	2×10^{-14} (2×10^{-11})	rs11692564	Zheng 2015
<i>ERC1</i>	5.6×10^{-12}	rs2887571	GEFOS2
<i>ESR1*</i>	4.0×10^{-35}	rs4869742	GEFOS1, GEFOS2, Styrkarsdottir 2008 & 2009
<i>F2</i>	5.1×10^{-18}	rs7932354	GEFOS1, GEFOS2
<i>FAM210A</i>	4.9×10^{-8} (8.8×10^{-13})	rs4796995	GEFOS2
<i>FAM3C</i>	1.0×10^{-11}	rs7776725	Cho 2009 [Ref. (59)]
<i>FAM9A</i>	1.2×10^{-8}	rs5934507	GEFOS2
<i>FAM9B</i>	1.2×10^{-8}	rs5934507	GEFOS2
<i>FKBP11*</i>	1.2×10^{-15}	rs12821008	GEFOS2
<i>FMN2</i>	1.9×10^{-9}	rs9287237	Paternoster 2013 [Ref. (60)]
<i>FOXC2*</i>	1.0×10^{-14}	rs10048146	GEFOS1, GEFOS2
<i>FOXL1</i>	1.0×10^{-14}	rs10048146	GEFOS1, GEFOS2
<i>FUBP3</i>	3.4×10^{-22}	rs7851693	GEFOS2
<i>GALNT3*</i>	4.8×10^{-10}	rs6710518	Duncan 2011
<i>GPATCH1</i>	6.6×10^{-11}	rs10416218	GEFOS2
<i>GPR68*</i>	2.0×10^{-15}	rs1286083	GEFOS2
<i>GREM2*</i>	1.9×10^{-9}	rs9287237	Paternoster 2013
<i>HDAC5</i>	1.7×10^{-8}	rs228769	GEFOS1
<i>IBSP*</i>	1.2×10^{-27} (1.7×10^{-9})	rs6532023	Duncan 2011
<i>IDUA</i>	5.2×10^{-15}	rs3755955	GEFOS2
<i>INSIG2</i>	1.2×10^{-10}	rs1878526	GEFOS2

Candidate gene	BMD p-value (Fracture p-value)	SNP	References
<i>JAG1</i> *	3.1x10 ⁻¹⁹	rs1878526	GEFOS2, Kung 2010 [Ref. (61)]
<i>KAL1</i>	1.2x10 ⁻⁸	rs5934507	GEFOS2
<i>KCNMA1</i>	5.0x10 ⁻¹⁹	rs7071206	GEFOS2
<i>KIAA2018</i>	4.1x10 ⁻¹⁰	rs1026364	GEFOS2
<i>LACTB2</i>	1.9x10 ⁻⁸	rs7017914	GEFOS2
<i>LEKR1</i>	4.5x10 ⁻¹²	rs344081	GEFOS2
<i>LGR4</i>	1.3x10 ⁻¹⁰	rs587777005	Styrkarsdottir 2013 [Ref. (62)]
<i>LIN7C</i>	4.9x10 ⁻⁸	rs10835187	GEFOS2
<i>LRP4</i> *	5.1x10 ⁻¹⁸	rs7932354	GEFOS1, GEFOS2
<i>LRP5</i> *	2.1x10 ⁻²⁶ (1.4x10 ⁻⁹)	rs3736228	GEFOS1, GEFOS2, Kaufman 2008 [Ref. (63)]
<i>MARK3</i>	5.2x10 ⁻¹⁶	rs11623869	GEFOS1, GEFOS2, Styrkarsdottir 2009
<i>MECOM</i> *	3.6x10 ⁻⁸	rs784288	Hwang 2013 [Ref. (64)]
<i>MEF2C</i>	4.5x10 ⁻⁶¹	rs1366594	GEFOS1, GEFOS2, Duncan 2011
<i>MEPE</i> *	1.2x10 ⁻²⁷ (1.7x10 ⁻⁸)	rs6532023	GEFOS2
<i>MPP7</i>	2.4x10 ⁻¹⁶	rs3905706	GEFOS2
<i>NBR1</i> *	2.0x10 ⁻¹¹	rs4792909	GEFOS, Styrkarsdottir 2009
<i>NTAN1</i>	1.7x10 ⁻¹⁰	rs4985155	GEFOS2
<i>PDXDC1</i>	1.7x10 ⁻¹⁰	rs4985155	GEFOS2
<i>PKDCC</i> *	1.3x10 ⁻⁹	rs7584262	GEFOS2
<i>PTHLH</i> *	1.9x10 ⁻¹²	rs7953528	GEFOS2
<i>RPS6KA5</i>	2.0x10 ⁻¹⁵	rs1286083	GEFOS2
<i>RSP03</i> *	3.0x10 ⁻⁸	rs13204965	Duncan 2011
<i>RUNX2</i> *	5.6x10 ⁻¹¹	rs11755164	GEFOS2
<i>SALL1</i> *	1.9x10 ⁻²²	rs1566045	GEFOS2
<i>SHFM1</i> *	8.1x10 ⁻⁴⁸ (5.9x10 ⁻¹¹)	rs4727338	GEFOS1, GEFOS2
<i>SLC25A13</i>	8.1x10 ⁻⁴⁸ (5.9x10 ⁻¹¹)	rs4727338	GEFOS2
<i>SMG6</i>	9.8x10 ⁻¹⁹	rs4790881	GEFOS2
<i>SMOC1</i> *	4.0x10 ⁻¹³	rs227425	Zhang 2014
<i>SOST</i> *	2.0x10 ⁻¹¹	rs4792909	GEFOS2, Styrkarsdottir 2009
<i>SOX4</i> *	2.7x10 ⁻¹³	rs9466056	GEFOS2
<i>SOX6</i> *	1.1x10 ⁻³²	rs7108738	GEFOS1, GEFOS2, Hsu 2010 [Ref. (65)]
<i>SOX9</i> *	1.9x10 ⁻¹¹	rs7217932	GEFOS2
<i>SP7</i> *	3.0x10 ⁻²⁰	rs2016266	GEFOS1, GEFOS2, Styrkarsdottir 2009, Timpson 2009 [Ref. (66)]
<i>SPP1</i> *	1.2x10 ⁻²⁷ (1.7x10 ⁻⁹)	rs6532023	GEFOS2
<i>SPTBN1</i>	2.3x10 ⁻¹⁸ (2.6x10 ⁻⁹)	rs4233949	GEFOS1, GEFOS2
<i>STARD3NL</i>	3.8x10 ⁻³⁸	rs6959212	GEFOS1, GEFOS2
<i>SUCO</i> *	8.5x10 ⁻¹⁵	rs479336	GEFOS2
<i>SUPT3H</i>	5.6x10 ⁻¹¹	rs11755164	GEFOS2
<i>TNFRSF11A (RANK)</i> *	1.6x10 ⁻¹⁷	rs884205	GEFOS1, GEFOS2, Styrkarsdottir 2009
<i>TNFRSF11B (OPG)</i> *	3.2x10 ⁻³⁹	rs2062377	GEFOS1, GEFOS2, Styrkarsdottir 2008, Richards 2008
<i>TNFSF11 (RANKL)</i> *	5.4x10 ⁻²⁵	rs9533090	GEFOS1, GEFOS2, Styrkarsdottir 2008 & 2009
<i>WLS</i> *	2.6x10 ⁻¹³	rs1430742	GEFOS1, Hsu 2010, Duncan 2011
<i>WNT16</i> *	3.2x10 ⁻⁵¹	rs3801387	GEFOS2, Zheng 2012 & 2015
<i>WNT5B</i> *	5.6x10 ⁻¹²	rs2887571	GEFOS2
<i>XKR9</i>	1.9x10 ⁻⁸	rs7017914	GEFOS2
<i>ZBTB40</i>	7.4x10 ⁻⁵⁷	rs6426749	GEFOS1, GEFOS2, Duncan 2011, Styrkarsdottir 2008
<i>ZNF408</i>	5.1x10 ⁻¹⁸	rs7932354	GEFOS1, GEFOS2

Strongest BMD/fracture p-values and corresponding single nucleotide polymorphisms (SNPs, identified according to dbSNP) are shown; only signals with a p-value less than 5x10⁻⁸ were included.
* Indicates genes for which additional evidence of involvement in bone development and metabolism is available.

comprised 13,786 and 8,557 individuals, respectively, and five major genes were identified: *OPG*, *RANKL*, *LRP5*, *ESR1* and *ZBTB40* (Table 3). As previously mentioned, *OPG* and *RANKL* regulate osteoclast differentiation and activation, and *LRP5* is a crucial mediator of Wnt signalling in bone formation. *ESR1*, which encodes for the oestrogen receptor, has long been considered a candidate gene for osteoporosis, based on earlier linkage studies and oestrogens' prominent physiological role in bone remodelling. A remaining locus identified by Stykarsdottir and cols., rs7524102, was strongly associated with both spine and hip BMD but obvious candidate genes lacked in its vicinity. Subsequent GWAS have confirmed this locus on larger cohorts (20,50-52), with p-value reaching 7.4×10^{-57} for association with hip BMD (20). Since these signals map to an intergenic region, the association has been attributed to the closest gene, *ZBTB40*. Up to now, a biological role for *ZBTB40* in human or animal health is largely unknown.

The largest published GWAS, GEFO2, was published in 2012 comprising data from > 80,000 subjects for BMD and > 130,000 fracture cases and controls (20). This study alone was able to identify 56 loci associated with BMD and 14 loci related to fracture risk, but still could only explain 5.8% of the genetic contribution to femoral neck BMD. These striking numbers epitomize both the great strength of GWAS in identifying genes related to common diseases and their great limitations in explaining the total genetic variability of such diseases, a concept commonly referred to as the missing heritability (5,7).

In 2015, a breakthrough GWAS based on whole-genome sequencing was published by Zheng and cols., with enough power to detect the effects of low-frequency variants (minor allele frequency [MAF] between 1-5%), which are usually not contemplated by genotype-based GWAS (53). Using this approach, the novel candidate gene *ENI* was identified, significantly related to both BMD and fracture risk. Animal models and *in vitro* studies indicate a possible role for *ENI* in osteoblasts, offering an exciting opportunity for the discovery of new mechanisms in bone formation (53). Finally, this study also suggests that lower frequency variants may have higher impact on BMD and fractures, warranting further studies.

A full list of the major 95 genes identified by GWAS is presented on Table 3. Remarkably, evidence of involvement in bone physiology is currently available for

only 41 genes (shown in table). The remaining 54 genes were selected based on their physical proximity to the GWAS signal, and therefore their biological association to bone fragility needs to be further scrutinized.

Future challenges

The genetics of osteoporosis have been increasingly unravelled during the past two decades. Gene defects underlying syndromic diseases with prominent skeletal phenotype have been identified, as well as genetic variants related to idiopathic and/or extreme osteoporosis. Technological advances have allowed unbiased *de novo* discovery of novel candidate genes and also of numerous loci associated to common osteoporosis. Through all these different strategies, several novel pathways regulating bone remodelling and matrix homeostasis have been recognised, pushing the boundaries of the therapeutic arsenal for bone fragility.

Concomitantly, however, gaps on our understanding of these processes have become apparent. For example, even with a great number of subjects and SNPs analysed, the largest GWAS to date can only explain 5.8% of the genetic contribution to BMD variability. Furthermore, most candidate genes or loci identified by high-throughput genomic analysis remain to have their role in bone metabolism fully elucidated. Altogether, these shortcomings pose as research challenges, warranting further exploration. In the foreseeable future, genomic analysis with enough power to detect the effects of low-frequency variants may lead to the discovery of missing heritability.

Gene defects so far identified in association with idiopathic osteoporosis are likely to have a major causative role in determining these phenotypes, but a clear genotype/phenotype correlation and precise cosegregation within families are still lacking in many cases, suggesting that a contribution of yet unfound genetic modifiers may exist. Further studies of idiopathic osteoporosis interrogating the role of candidate genes identified by GWAS for which a function in bone is still unknown might help identify such modifiers or even uncover major causative roles for some of these novel candidates. Additionally, animal models and *in vitro* studies may help to clarify their biological function in bone strength.

In conclusion, major advances in the genetics of bone fragility have allowed a deeper understanding of bone remodelling, with translational implications in many

instances. Several experimental sources of candidate genes for osteoporosis have arisen, particularly due to the study of rarer informative individuals and families but also through the advent of genome-scale methods for genetic analysis. It is hoped that the continued and concerted effort of clinicians and researchers, and ongoing technological progress will further illuminate the genetic basis of osteoporosis and enable more precise treatment strategies in the near future.

Acknowledgements: M.G.M.R.-B. holds an institutional Capes scholarship (Program 33002010062P5), and B.F.-d.-S. holds a Sao Paulo Research Foundation (Fapesp) Young Investigator award (grant number 2011/12696-4).

Disclosure: no potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Consensus Development Conference. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1991;90:107-10.
- Cooper C, Atkinson EJ, Jacobsen SJ, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol.* 1993;137:1001-5.
- Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int.* 1994;4:368-81.
- Siris ES, Adler R, Bilezikian J, Bolognese M, Dawson-Hughes B, Favus MJ, et al. The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group. *Osteoporos Int.* 2014;25:1439-43.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461:747-53.
- Deng HW, Chen WM, Recker S, Stegman MR, Li JL, Davies KM, et al. Genetic determination of Colles' fracture and differential bone mass in women with and without Colles' fracture. *J Bone Miner Res.* 2000;15:1243-52.
- Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet.* 2012;13:576-88.
- Andrew T, Antoniadou L, Scurrell KJ, Macgregor AJ, Spector TD. Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD. *J Bone Miner Res.* 2005;20:67-74.
- Pope FM, Nicholls AC, McPheat J, Talmud P, Owen R. Collagen genes and proteins in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 1985;22:466-78.
- Fratini A, Orchard PJ, Sobacchi C, Giliani S, Abinun M, Mattsson JP, et al. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet.* 2000;25:343-6.
- Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001;107:513-23.
- Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paepers BW, Kovacevich BR, Prohl S, et al. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet.* 2001;68:577-89.
- Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 2001;10:537-43.
- Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O, et al. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet.* 2013;92:565-74.
- Laine CM, Joeng KS, Campeau PM, Kiviranta R, Tarkkonen K, Grover M, et al. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med.* 2013;368:1809-16.
- van Dijk FS, Zillikens MC, Micha D, Riessland M, Marcelis CL, de Die-Smulders CE, et al. PLS3 mutations in X-linked osteoporosis with fractures. *N Engl J Med.* 2013;369:1529-36.
- Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM, Karasik D. Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet.* 2007;8 Suppl 1:S14.
- Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet.* 2008;371:1505-12.
- Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med.* 2008;358:2355-65.
- Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012;44:491-501.
- McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med.* 2014;370:412-20.
- Masi L, Agnusdei D, Bilezikian J, Chappard D, Chappard R, Cianferotti L, et al. Taxonomy of rare genetic metabolic bone disorders. *Osteoporos Int.* 2015;26:2529-58.
- Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Lancet.* 2004;363:1377-85.
- Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC. New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7:540-57.
- Sillence DO, Senn A, Danks DM. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 1979;16:101-16.
- Cho TJ, Lee KE, Lee SK, Song SJ, Kim KJ, Jeon D, et al. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta type V. *Am J Hum Genet.* 2012;91:343-8.
- Semler O, Garbes L, Keupp K, Swan D, Zimmermann K, Becker J, et al. A mutation in the 5'-UTR of IFITM5 creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. *Am J Hum Genet.* 2012;91:349-57.
- Marini JC, Blissett AR. New genes in bone development: what's new in osteogenesis imperfecta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:3095-103.
- Bonafe L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet A.* 2015;167:2869-92.
- Kelley BP, Malfait F, Bonafe L, Baldrige D, Homan E, Symoens S, et al. Mutations in FKBP10 cause recessive osteogenesis imperfecta and Bruck syndrome. *J Bone Miner Res.* 2011;26:666-72.
- Garbes L, Kim K, Riess A, Hoyer-Kuhn H, Beleggia F, Bevo A, et al. Mutations in SEC24D, encoding a component of the COPII machinery, cause a syndromic form of osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet.* 2015;96:432-9.
- Stark Z, Savarirayan R. Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2009;4:5.

33. Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, Desnick RJ. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*. 1996;273:1236-8.
34. Bone HG, Dempster DW, Eisman JA, Greenspan SL, McClung MR, Nakamura T, et al. Odanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis: development history and design and participant characteristics of LOFT, the Long-Term Odanacatib Fracture Trial. *Osteoporos Int*. 2015;26:699-712.
35. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*. 2013;19:179-92.
36. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med*. 2002;346:1513-21.
37. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Laczka C, et al. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet*. 2002;39:91-7.
38. Simpson MA, Irving MD, Asilmaz E, Gray MJ, Dafou D, Elmslie FV, et al. Mutations in NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss. *Nat Genet*. 2011;43:303-5.
39. Isidor B, Lindenbaum P, Pichon O, Bezieau S, Dina C, Jacquemont S, et al. Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis. *Nat Genet*. 2011;43:306-8.
40. Bianchi ML. Hypophosphatasia: an overview of the disease and its treatment. *Osteoporos Int*. 2015;26:2743-57.
41. Spotila LD, Constantinou CD, Sereda L, Ganguly A, Riggs BL, Prockop DJ. Mutation in a gene for type I procollagen (COL1A2) in a woman with postmenopausal osteoporosis: evidence for phenotypic and genotypic overlap with mild osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:5423-7.
42. Spotila LD, Colige A, Sereda L, Constantinou-Deltas CD, Whyte MP, Riggs BL, et al. Mutation analysis of coding sequences for type I procollagen in individuals with low bone density. *J Bone Miner Res*. 1994;9:923-32.
43. Hartikka H, Makitie O, Mannikko M, Doria AS, Daneman A, Cole WG, et al. Heterozygous mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with primary osteoporosis in children. *J Bone Miner Res*. 2005;20:783-9.
44. Korvala J, Loija M, Makitie O, Sochett E, Juppner H, Schnabel D, et al. Rare variations in WNT3A and DKK1 may predispose carriers to primary osteoporosis. *Eur J Med Genet*. 2012;55:515-9.
45. Fahiminiya S, Majewski J, Roughley P, Roschger P, Klaushofer K, Rauch F. Whole-exome sequencing reveals a heterozygous LRP5 mutation in a 6-year-old boy with vertebral compression fractures and low trabecular bone density. *Bone*. 2013;57:41-6.
46. Campos-Obando N, Oei L, Hoefsloot LH, Kiewiet RM, Klaver CC, Simon ME, et al. Osteoporotic vertebral fractures during pregnancy: be aware of a potential underlying genetic cause. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:1107-11.
47. Cook FJ, Mumm S, Whyte MP, Wenkert D. Pregnancy-associated osteoporosis with a heterozygous deactivating LDL receptor-related protein 5 (LRP5) mutation and a homozygous methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism. *J Bone Miner Res*. 2014;29:922-8.
48. Fahiminiya S, Majewski J, Al-Jallad H, Moffatt P, Mort J, Glorieux FH, et al. Osteoporosis caused by mutations in PLS3: clinical and bone tissue characteristics. *J Bone Miner Res*. 2014;29:1805-14.
49. Laine CM, Wessman M, Toivainen-Salo S, Kaunisto MA, Mayranpaa MK, Laine T, et al. A novel splice mutation in PLS3 causes X-linked early onset low-turnover osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2015;30:510-8.
50. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet*. 2009;41:15-7.
51. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2009;41:1199-206.
52. Duncan EL, Danoy P, Kemp JP, Leo PJ, McCloskey E, Nicholson GC, et al. Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet*. 2011;7:e1001372.
53. Zheng HF, Forgetta V, Hsu YH, Estrada K, Rosello-Diez A, Leo PJ, et al. Whole-genome sequencing identifies EN1 as a determinant of bone density and fracture. *Nature*. 2015;526:112-7.
54. Xiong DH, Liu XG, Guo YF, Tan LJ, Wang L, Sha BY, et al. Genome-wide association and follow-up replication studies identified ADAMTS18 and TGFBR3 as bone mass candidate genes in different ethnic groups. *Am J Hum Genet*. 2009;84:388-98.
55. Guo Y, Tan LJ, Lei SF, Yang TL, Chen XD, Zhang F, et al. Genome-wide association study identifies ALDH7A1 as a novel susceptibility gene for osteoporosis. *PLoS Genet*. 2010;6:e1000806.
56. Tan LJ, Wang ZE, Wu KH, Chen XD, Zhu H, Lu S, et al. Bivariate Genome-Wide Association Study Implicates ATP6V1G1 as a Novel Pleiotropic Locus Underlying Osteoporosis and Age at Menarche. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:E1457-66.
57. Zhang L, Choi HJ, Estrada K, Leo PJ, Li J, Pei YF, et al. Multistage genome-wide association meta-analyses identified two new loci for bone mineral density. *Hum Mol Genet*. 2014;23:1923-33.
58. Zheng HF, Tobias JH, Duncan E, Evans DM, Eriksson J, Paternoster L, et al. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genet*. 2012;8:e1002745.
59. Cho YS, Go MJ, Kim YJ, Heo JY, Oh JH, Ban HJ, et al. A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits. *Nat Genet*. 2009;41:527-34.
60. Paternoster L, Lorentzon M, Lehtimäki T, Eriksson J, Kahonen M, Raitakari O, et al. Genetic determinants of trabecular and cortical volumetric bone mineral densities and bone microstructure. *PLoS Genet*. 2013;9:e1003247.
61. Kung AW, Xiao SM, Cherny S, Li GH, Gao Y, Tso G, et al. Association of JAG1 with bone mineral density and osteoporotic fractures: a genome-wide association study and follow-up replication studies. *Am J Hum Genet*. 2010;86:229-39.
62. Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Sulem P, Gudbjartsson DF, Sigurdsson A, Jonasdottir A, et al. Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits. *Nature*. 2013;497:517-20.
63. Kaufman JM, Ostertag A, Saint-Pierre A, Cohen-Solal M, Boland A, Van Pottelbergh I, et al. Genome-wide linkage screen of bone mineral density (BMD) in European pedigrees ascertained through a male relative with low BMD values: evidence for quantitative trait loci on 17q21-23, 11q12-13, 13q12-14, and 22q11. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:3755-62.
64. Hwang JY, Lee SH, Go MJ, Kim BJ, Kou I, Ikegawa S, et al. Meta-analysis identifies a MECOM gene as a novel predisposing factor of osteoporotic fracture. *J Med Genet*. 2013;50:212-9.
65. Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Farber CR, Demissie S, Soranzo N, et al. An integration of genome-wide association study and gene expression profiling to prioritize the discovery of novel susceptibility loci for osteoporosis-related traits. *PLoS Genet*. 2010;6:e1000977.
66. Timpson NJ, Tobias JH, Richards JB, Soranzo N, Duncan EL, Sims AM, et al. Common variants in the region around Osterix are associated with bone mineral density and growth in childhood. *Hum Mol Genet*. 2009;18:1510-7.

3. Artigo original submetido para publicação no *Journal of Bone and Mineral Research*.

Targeted massively parallel sequencing of 128 candidate genes for bone fragility reveal potentially pathogenic variants and digenic/oligogenic interactions in a Brazilian cohort of idiopathic, severe or familial osteoporosis

Journal:	<i>Journal of Bone and Mineral Research</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Rocha-Braz, Manuela; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Laboratorio de Endocrinologia Celular e Molecular LIM-25 e Unidade de Doencas Osteometabolicas, Divisao de Endocrinologia</p> <p>França, Monica; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Laboratorio de Hormonios e Genetica Molecular LIM-42, Divisao de Endocrinologia</p> <p>Fernandes, Adriana; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Laboratorio de Endocrinologia Celular e Molecular LIM-25 e Unidade de Doencas Osteometabolicas, Divisao de Endocrinologia</p> <p>Lerario, Antonio; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Laboratorio de Hormonios e Genetica Molecular LIM-42, Divisao de Endocrinologia; Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Laboratorio de Sequenciamento em Larga Escala (SELA); University of Michigan, Department of Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes</p> <p>Zanardo, Evelin; Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Laboratorio de Citogenomica, Departamento de Patologia</p> <p>de Santana, Lucas; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Monogenic Diabetes Group, Laboratorio de Endocrinologia Celular e Molecular LIM-25 e Unidade de Endocrinologia Genetica, Divisao de Endocrinologia</p> <p>Kulikowski, Leslie; Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, 5Laboratorio de Citogenomica, Departamento de Patologia</p> <p>Martin, Regina; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Laboratorio de Hormonios e Genetica Molecular LIM-42, Divisao de Endocrinologia</p> <p>Mendonca, Berenice; Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Laboratorio de Sequenciamento em Larga Escala (SELA)</p> <p>Ferraz-de-Souza, Bruno; Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Laboratorio de Endocrinologia Celular e Molecular LIM-25 e Unidade de Doencas Osteometabolicas, Divisao de Endocrinologia</p>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Keywords:	Osteoporosis < DISEASES AND DISORDERS OF/RELATED TO BONE, GENETIC RESEARCH, Human association studies < GENETIC RESEARCH
Abstract:	<p>Osteoporosis is a multifactorial disorder with high estimated heritability. The genetic basis of osteoporosis has been sought mainly by genome-wide association studies (GWAS), and by molecular analyses of Mendelian forms of bone fragility, with few studies in idiopathic osteoporosis. Advances in sequencing technology now allow concurrent analysis of multiple candidate genes in this setting. Here, we aimed to identify allelic variants in 128 candidate genes in 28 cases of idiopathic, severe or familial osteoporosis, using targeted massively parallel sequencing. Coding regions and 25-bp boundaries were captured and sequenced using Illumina NextSeq. Rare (MAF<0.01) stop-gain, indel, splice site, or nonsynonymous variants predicted to alter protein function were considered variants of interest, as well as copy-number variants. Variants were confirmed by Sanger sequencing or SNP array, and submitted to segregation analysis when possible. Males represented 54% of the cohort, the median age at diagnosis was 44 years and 84% had fractures. Twenty-eight heterozygous potentially pathogenic variants (PPVs) were identified in 71% of the cohort, including 26 nonsynonymous variants, an in-frame 9-bp deletion, and an exonic deletion. Only one of these variants had been previously associated with idiopathic osteoporosis. An association of 2 or more PPVs in different genes was found in 21% of the cohort, including a young woman with severe osteoporosis bearing WNT1, PLS3 and NOTCH2 variants. Twenty-five percent of the PPVs were found in well-established candidate genes (WNT1, PLS3, COL1A1, COL1A2), while 57% were found in GWAS candidate genes, including NBR1 and GPR68, previously associated with osteoblast and osteoclast defects in mice. Our results validate the role of GWAS candidate genes in the molecular pathophysiology of osteoporosis and indicate a prominent role for digenic/oligogenic inheritance. The identification of pathogenic variants leading to osteoporosis may allow individualized clinical management of patients and relatives in the future.</p>

SCHOLARONE™
Manuscripts
Review Only