

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TACCYANNA MIKULSKI ALI

**Doenças monogênicas com densidade mineral óssea diminuída:  
avaliação genética e clínica focada em pacientes com osteogênese  
imperfeita**

**Monogenic diseases with low bone mineral density: clinical and  
genetic evaluation focused on patients with osteogenesis  
imperfecta**

SÃO PAULO

2023

TACCYANNA MIKULSKI ALI

**Doenças monogênicas com densidade mineral óssea diminuída:  
avaliação genética e clínica focada em pacientes com osteogênese  
imperfeita**

**Monogenic diseases with low bone mineral density: clinical and  
genetic evaluation focused on patients with osteogenesis  
imperfecta**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de  
Mestre no Programa de Aconselhamento Genético e  
Genômica Humana, na Área de Genética

Orientadora: Dra. Débora Romeo Bertola

SÃO PAULO

2023

Mikulski Ali, Taccyanna

Doenças monogênicas com densidade mineral óssea diminuída: avaliação genética e clínica focada em pacientes com osteogênese imperfeita / Mikulski Ali Taccyanna ; orientadora Romeo Bertola Débora -- São Paulo, 2023.

90 p. + anexo

Dissertação (Mestrado Profissional) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

1. Densidade mineral óssea diminuída. 2. Osteogênese imperfeita. 3. Doenças monogênicas. 4. Sequenciamento de nova geração. 5. Aconselhamento genético. I. Romeo Bertola, Débora, orient. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:

Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228



---

Profª Drª Débora Romeo Bertola

Dedico este trabalho a todos os pacientes  
e famílias do estudo.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a minha família, principalmente meus pais Alberto (*in memorian*) e Marlene e meu marido Ivan pela compreensão nesta nova etapa da minha vida. Foi desafiador realizar o trabalho em época de pandemia, mas todo o suporte de vocês fez diferença.

À minha orientadora Dra. Débora Romeo Bertola pela dedicação, disponibilidade, ensinamentos e paciência em dividir um pouco dos seus conhecimentos comigo. Sem dúvidas uma profissional e pesquisadora exemplar.

Às Dras. Regina Célia Mingroni Netto e Célia Koiffmann por compartilharem seus conhecimentos nas discussões científicas, aulas e além de auxílio e direcionamento durante o curso de pós-graduação.

Aos professores do curso de pós-graduação pelas aulas e ensinamentos durante o período de pandemia: Dra. Célia Koiffmann, Dra. Leila Koiffmann, Dra. Regina Célia Mingroni Netto, Dra. Mariz, Dr. Michel, Dr. Diego, Dra. Ângela Morgante e Dra. Ana Kreprischi.

À secretaria da pós-graduação, Helder e principalmente a Erika Takamoto por todo auxílio, gentileza e dedicação diária.

Aos preceptores do estágio de ambulatório de aconselhamento genético pelo cuidado com os pacientes, profissionalismo e disponibilidade: Dra. Débora Bertola, Dra. Maria Rita-Passos Bueno, Dra. Cristina Carvalho, Dra. Vivian Romanholi Coria, Ana Girardi, Dr. Rodrigo Fock, Dra. Jéssica Spolaor, Dra. Atmis Haidar, Dra. Gisele Perillo, Dra. Thayse Telecio. Também à Silvia e Ana da secretaria do Genoma.

Aos profissionais que fizeram parte deste trabalho de forma direta ou indireta: Dra. Isabela Pasa, Dra. Bianca Linnenkamp, Dr. Guilherme Yamamoto, Dra. Rachel Honjo, Dr. Hamilton Cabral de Menezes Filho, Dra. Chong Ae Kim, Dra. Luciane Martins, Dr. Luis Gustavo F Lessa, Dra. Monize Lazar, Dra. Kamila R Kantovitz, Dr. Mauro Santamaria, Dra. Cássia Araújo, Dra. Carolina Ramos, Dr. Brian L Foster, Dr. José Francisco Franco e Dr. Francisco H Nociti Jr. A contribuição de cada um permitiu o enriquecimento do estudo e além de duas publicações científicas.

Por fim e não menos importante, aos colegas da pós-graduação que tive oportunidade de conhecer durante o curso.

## RESUMO

ALI TM. Doenças monogênicas com densidade mineral óssea diminuída: avaliação genética e clínica focada em pacientes com osteogênese imperfeita [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2023.

Algumas doenças monogênicas apresentam como sinal cardinal a diminuição da densidade mineral óssea (DMO), com destaque para a osteogênese imperfeita (OI), doença rara, com grande heterogeneidade genética de *locus* e padrões de herança distintos. Embora vários genes já tenham sido identificados associados a este fenótipo, o conhecimento de toda a arquitetura genômica responsável pelo metabolismo ósseo variações da DMO e osteoporose ainda requer estudos. A identificação de variantes responsáveis pela OI, tem implicações importantes para o aconselhamento genético, manejo de pacientes, além de possibilitar a descoberta de terapias direcionadas de maior efetividade no futuro. Este estudo tem por objetivo avaliar as características clínico-radiológicas e bases moleculares por sequenciamento de nova geração (painel de genes ou sequenciamento do exoma) de um grupo de indivíduos com diminuição da DMO. A casuística foi composta de 43 indivíduos (32 probandos) com DMO diminuída, 27 deles com diagnóstico de OI formas moderadas/graves/letais e cinco com doenças mais raras (hipofosfatasia, síndromes da osteoporose e pseudo-glioma e Stüve-Wiedemann). A casuística apresentou uma distribuição semelhante entre os sexos, com idade entre 1 dia de vida até 28 anos. Foram identificadas variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em 24/27 (88,9%) dos indivíduos com OI e em todos os outros probandos com os diagnósticos adicionais incluídos, oito delas não reportadas na literatura. Dentre as variantes identificadas nos pacientes com OI, 17 (71%) apresentam variantes causativas em *COL1A1* /*COL1A2* e sete (29%), variantes em genes relacionados a formas recessivas de OI, havendo consanguinidade declarada em quatro dentre as cinco famílias com variantes em homozigose. Nos indivíduos com OI tipo II, as variantes foram identificadas majoritariamente em *COL1A2*. Dentre as variantes em genes associados a formas recessivas, destaca-se a variante missense identificada em *CRTAP* em dois indivíduos, previamente reportada na literatura brasileira como de significado incerto. Nos casos inconclusivos não foram identificadas variantes em genes pertencentes a vias de sinalização Wnt e RANKL. Na associação genótipo-fenótipo, observou-se que a presença de escleras azuladas/acinzentadas e dentinogênese imperfeita eram estatisticamente mais prevalentes nos indivíduos com variantes nos genes *COL1A1* /*COL1A2* comparados com aqueles que apresentavam as formas recessivas de OI. Na população

brasileira, os dados conjuntos deste estudo com os obtidos na literatura, apontam para os genes *FKBP10* e *CRTAP* como sendo os mais prevalentes, com destaque para a variante p.Leu52Pro em *CRTAP*, previamente descrita e classificada como de significado incerto e que, com este estudo, foi reclassificada como provavelmente patogênica. Os dados obtidos mostram que a positividade do teste molecular é alta para este grupo de doenças monogênicas com baixa DMO, compatível com os dados da literatura, e amplia as variantes associadas a estes fenótipos, incluindo aquelas presentes nos genes associados a formas recessivas de OI que são menos conhecidas globalmente pela raridade deste grupo. Dentre os indivíduos com outros diagnósticos de doenças com baixa densidade óssea, destaca-se a síndrome de Stüve-Wiedemann pela raridade, gravidade do quadro e a presença da variante do tipo deleção (éxons 15 a 20) em homozigose em *LIFR*, a mesma alteração já encontrada em outro indivíduo da população brasileira, sugerindo um efeito fundador.

**Palavras-chave:** Densidade mineral óssea diminuída, osteogênese imperfeita, doenças monogênicas, sequenciamento de nova geração, aconselhamento genético.

## ABSTRACT

ALI TM. Monogenic diseases with low bone mineral density: clinical and genetic evaluation focused on patients with osteogenesis imperfecta [Dissertation]. São Paulo: Institute of Biosciences, University of São Paulo; 2023.

Some monogenic diseases have, as a cardinal sign, decreased bone mineral density (BMD), particularly osteogenesis imperfecta (OI), a rare disease with great locus genetic heterogeneity and distinct patterns of inheritance. Although several genes have already been identified associated with this phenotype, knowledge of the entire genomic architecture responsible for bone metabolism, BMD variations and osteoporosis still requires further studies. The identification of variants responsible for OI has important implications for genetic counseling, patient management, in addition to enabling the discovery of targeted therapies, with greater effectiveness in the future. This study aims to evaluate the clinical-radiological characteristics and molecular basis by next-generation sequencing (targeted gene panel or exome sequencing) of a group of individuals with decreased BMD. The cohort consisted of 43 individuals (32 probands) with reduced BMD, 27 of them diagnosed with moderate/severe/lethal forms of OI and five with rarer diseases (hypophosphatasia, osteoporosis and pseudo-glioma and Stüve-Wiedemann syndromes). The cohort showed a similar distribution between genders, with an age ranging from 1 day of life up to 28 years. Pathogenic/probably pathogenic variants were identified in 24/27 (88.9%) of the individuals with OI and in all the other included probands with the additional diagnoses, eight of these variants not reported in the literature. Among the variants identified in patients with OI, 17 (71%) were in *COL1A1*/*COL1A2* and seven (29%) variants in genes related to recessive forms of OI, with consanguinity declared in four of the five families with homozygous variants. In individuals with OI type II, the variants were mostly identified in *COL1A2*. Among the variants in genes associated with recessive forms, the missense variant identified in *CRTAP* in two individuals stands out, previously reported in the Brazilian literature as of uncertain significance. In inconclusive cases, no variants were identified in genes belonging to Wnt and RANKL signaling pathways. In the genotype-phenotype correlation, it was observed that the presence of bluish/gray sclera and dentinogenesis imperfecta were statistically more prevalent in individuals with variants in the *COL1A1*/*COL1A2* genes compared to those who presented the recessive forms of OI. In the Brazilian population, the combined data of this study with those obtained in the literature, point toward *FKBP10* and *CRTAP* as being the most prevalent genes, with emphasis on the p.Leu52Pro variant in *CRTAP*, previously described and classified

as of uncertain significance and which, with this study, was reclassified as probably pathogenic. The data obtained show that the positivity of the molecular test is high for this group of monogenic diseases with low BMD, compatible with the literature data, and expands the variants associated with these phenotypes, including those present in the genes associated with recessive forms of OI that are less known globally due to the rarity of this group. Among individuals with other diagnoses of diseases with low bone density, Stüve-Wiedemann syndrome stands out due to its rarity, severity of the condition and the presence of the homozygous deletion-type variant (exons 15 to 20) in *LIFR*, the same alteration already found in another individual in the Brazilian population, suggesting a founder effect.

**Keywords:** Low bone mineral density, osteogenesis imperfecta, monogenic diseases, next-generation sequencing, genetic counselling

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição de variantes detectadas neste estudo em <i>COL1A1</i> nos probandos com OI moderada/grave/letal. ....	49
<b>Figura 2</b> - Distribuição de variantes detectadas neste estudo em <i>COL1A2</i> nos probandos com OI moderada/grave/letal. ....	50
<b>Figura 3</b> - Imagens radiológicas dos pacientes com as formas recessivas de OI.....	51
<b>Figura 4</b> - Babygrama de pacientes com OI tipo II. ....	52
<b>Figura 5</b> - Imagens do raio-X dos probandos com outras doenças ósseas com baixa DMO ..	53
<b>Figura 6</b> - Deleção em homozigose nos éxons 15-20 do gene <i>LIFR</i> detectada na amostra do paciente F28 com fenótipo de STW. ....	54
<b>Figura 7</b> - Deleção do gene <i>ALPL</i> identificada na amostra da paciente F32 com quadro de hipofosfatasia detectada pelo software CNVKit. ....	54

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1- Classificação da OMS dos valores de DMO em relação à osteoporose.....	17
Quadro 2 - Classificação clínica da OI de acordo com Sillence e colaboradores proposta em 1979 com quinto tipo adicionado em 2015 .....	22
Quadro 3 - Agentes terapêuticos para prevenir fraturas em pacientes com OI.....	25
Quadro 4 - Classificação dos diferentes tipos de OI no banco de dados do OMIM, levando-se em consideração o gene responsável e o padrão de herança .....	27
Quadro 5 - Teste molecular realizado no CEGH-CEL/IB-USP .....	35
Quadro 6 - Probandos e familiares, hipótese clínica e achados fenotípicos.....	40
Quadro 7 - Análise molecular dos probandos com fenótipo de OI e outras doenças monogênicas com DMO diminuída e familiares avaliados .....	45
Quadro 8 - Correlação de achados fenotípicos e genes envolvidos na casuística de pacientes com OI.....	55
Quadro 9 - Variantes reportadas em estudos com pacientes brasileiros.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AbraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACMG	Colégio Americano de Genética Médica e Genômica
AD	autossômica dominante
AR	autossômica recessiva
BP	bisfosfonatos
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEGH-CEL/IB-USP	Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do
CNV	variante de número de cópias
DI	dentinogênese imperfeita
DMO	densidade mineral óssea
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvios padrão
DXA	absorciometria de raios X de dupla energia
ECLAMC	Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
ER	retículo endoplasmático
Erk	proteína quinase regulada por sinal extracelular
EV	endovenosa
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
GnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
GWAS	estudos de associação em escala genômica
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HPP	hipofosfatasia
ICr/HC-FMUSP	Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
	Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo
JAK/STAT	Janus Quinase e Transdutor de Sinal/Ativador da Transcrição
LoF	variante de perda de função
LOVD	Leiden Open Variation Database

LRP5	receptor de lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NMD	decaimento do RNA mensageiro (mRNA) mediado por variantes <i>nonsense</i>
OI	Osteogênese Imperfeita
OIVD	Osteogenesis Imperfecta Variant Database
OMIM	<i>Online Mendelian Heritance in Man</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPPG	síndrome da osteoporose pseudoglioma
P1	painel 1
P2	painel 2
P3	painel 3
P4	painel 4
pb	pares de base
PCDT	Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas
PGT-M	Teste Genético Pré-Implantacional para Doenças Monogênicas
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PTH	paratormônio
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
REVEL	<i>Rare Exome Variant Ensemble Learner</i>
Scl-AB	anticorpo neutralizante contra esclerostina
SNPs	polimorfismos de nucleotídeo único
SSCP	<i>single-strand conformation polymorphism</i>
STW	síndrome de Stüve-Wiedemann
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNSALP	fosfatase alcalina não tecido-específica
VUS	variante de significado incerto
WES	sequenciamento do exoma
WNT	Wingless
XLR	ligado ao X recessiva

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 OSSO: FUNÇÃO E COMPOSIÇÃO .....	16
1.2 DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E OSTEOPOROSE.....	16
1.3 DOENÇAS MONOGÊNICAS DE RELEVÂNCIA PARA A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E OSTEOPOROSE .....	18
1.4 OSTEOGÊNESE IMPERFEITA .....	21
1.4.1 Classificação de acordo com achados clínicos.....	21
1.4.2 Manejo clínico dos pacientes .....	23
1.4.3 Tratamento medicamentoso para pacientes.....	24
1.4.4 Genes envolvidos .....	25
1.4.5 Estudos genéticos de grupos de pacientes com osteogênese imperfeita no Brasil .....	28
1.5 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) E DISPLASIAS ESQUELÉTICAS ....	30
2 OBJETIVOS .....	32
2.1 OBJETIVO GERAL .....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.1 APROVAÇÃO ÉTICA .....	33
3.1.1 Critérios de inclusão no estudo .....	33
3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	33
3.3 AVALIAÇÃO GENÉTICA DA POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	34
3.3.1 Fluxo de trabalho envolvendo painéis e exoma .....	35
3.3.2 Análise dos resultados dos painéis e exoma.....	36
3.3.3 Classificação de variantes de acordo com os critérios do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica.....	37
3.3.4 Análise de CNV – caso hipofosfatasia.....	38
3.4 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO DE PACIENTES COM OI .....	38
3.5 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DE CASOS DE OI .....	38
4 RESULTADOS.....	39

	15
4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.....	39
4.2. DADOS MOLECULARES.....	43
4.2 CORRELAÇÃO FENÓTIPO-GENÓTIPO DE PACIENTES OI.....	55
4.3 LEVANTAMENTO DE CASOS DE OI COM AVALIAÇÃO MOLECULAR EM PACIENTES BRASILEIROS PUBLICADOS .....	55
5 DISCUSSÃO.....	67
5.1 PACIENTES COM OI.....	67
5.2 PACIENTES COM OUTRAS DOENÇAS MONOGÊNICAS COM BAIXA DMO.....	75
5.3 ACONSELHAMENTO GENÉTICO .....	76
6 CONCLUSÃO .....	79
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
8 ANEXOS.....	91

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OSSO: FUNÇÃO E COMPOSIÇÃO

O osso exerce funções importantes no corpo, como locomoção, suporte e proteção dos tecidos moles e da medula óssea, sendo dividido em dois tipos principais: (a) cortical, que fornece uma função mecânica e protetora e (b) trabecular, que fornece força e, mais importante, desempenha a maior parte da função metabólica (FENG & MCDONALD, 2011).

Para manter sua integridade, os ossos corticais e trabeculares são submetidos à remodelação óssea. Cerca de 5 a 10% do osso existente é substituído no esqueleto adulto humano a cada ano. Esse processo é feito por um grupo de células denominadas coletivamente de unidade de remodelação óssea, constituída pelos osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e as células do revestimento ósseo. O ciclo de remodelação óssea é dividido nas seguintes fases: iniciação, reabsorção, reversão e formação e ocorre simultaneamente em vários locais do esqueleto (HAUGE *et al.*, 2001).

Na remodelação óssea normal, um equilíbrio entre a reabsorção óssea (mediada por osteoclastos) e a formação do osso (mediada por osteoblastos) é rigidamente regulado e mantido por uma série de mecanismos sinalizadores coordenados para garantir que, em osso saudável maduro, não haja grandes mudanças na massa óssea ou resistência mecânica após cada ciclo de remodelação (FENG & MCDONALD, 2011).

Enquanto a formação óssea supera a reabsorção durante a infância, a formação e reabsorção óssea estão em equilíbrio durante a idade adulta jovem (DATTA *et al.*, 2008). No entanto, a perturbação do equilíbrio entre as funções desempenhadas pelos osteoclastos e pelos osteoblastos pode resultar em anormalidades patológicas na densidade mineral óssea (DMO) (BOUDIN & VAN HUL, 2017).

## 1.2 DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E OSTEOPOROSE

A DMO é uma medida do conteúdo mineral inorgânico no osso e é uma das avaliações mais informativas da qualidade óssea em estudos clínicos e investigações forenses. Uma baixa DMO aumenta o risco de fraturas ósseas sendo usada para definir a osteoporose (GREGSON *et al.*, 2013). Os métodos radiográficos convencionais permitem a visualização da estrutura óssea, mas requer uma perda óssea considerável para que esta alteração seja detectada. Desta forma, não é uma técnica sensível o suficiente para realizar o diagnóstico precoce e o tratamento

da osteoporose. A densitometria óssea, por outro lado, ajuda a detectar a perda mineral óssea em um estágio inicial, pois fornece uma medição quantitativa precisa da DMO (CHUN, 2011). Os resultados dos testes de densitometria óssea são expressos em Z-score e T-score. Z-score é o número de desvios padrão (DP) do valor médio de DMO para pessoas da mesma idade e sexo. Já o T-score é o número de DP da DMO média para adultos jovens (25-45 anos) e -2,5 representa um valor de DMO que é 2,5 DP abaixo da DMO média para adultos jovens, sendo indicativo de osteoporose, de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 1994; NIH, 2001) – ver **quadro 1**.

**Quadro 1-** Classificação da OMS dos valores de DMO em relação à osteoporose

<b>Classificação</b>	<b>T-score</b>
<b>Normal</b>	-1.0 ou maior
<b>Osteopenia</b>	Entre -1.0 e -2.5
<b>Osteoporose</b>	-2.5 ou inferior
<b>Osteoporose severa</b>	-2.5 ou inferior com uma fratura por fragilidade

A avaliação da DMO de locais específicos (coluna ou o quadril) ou de todo o esqueleto pela absorciometria de raios-X, baseia-se na absorção de raios-X pelos cristais de cálcio no osso. Uma máquina de absorciometria de raios X de dupla energia (DXA) envia um feixe fino de raios-X de baixa dose com dois picos de energia distintos através dos ossos dos indivíduos. Um pico é absorvido principalmente pelos tecidos moles e o outro pelo osso, sendo a DMO calculada a partir da diferença de absorção entre osso e tecido mole. O *software* de análise calcula a densidade numérica do osso a partir da imagem e a compara com a média de adultos jovens saudáveis e com o controle pareado por idade da população de referência. O teste de DMO com DXA leva até 30 minutos (LORENTE-RAMOS *et al.*, 2012).

Na faixa etária pediátrica, o diagnóstico da osteoporose é desafiador em virtude da variação no crescimento e na maturação puberal que dificultam a interpretação dos valores de DMO. Portanto, medidas de DXA ajustadas para idade, sexo e tamanho corporal (Z-scores) devem ser consideradas com o histórico de fraturas ósseas. Uma história de fratura patológica envolve (i)  $\geq 2$  fraturas de ossos longos clinicamente significativas até a idade de 10 anos, (ii)  $\geq 3$  fraturas de ossos longos clinicamente significativas até a idade de 19 anos, ou (iii) uma ou mais fraturas por compressão vertebral na ausência de trauma de alta energia, significando uma perda  $\geq 20\%$  na altura anterior, média ou posterior da vértebra. No entanto, uma fratura por

compressão vertebral por si só é suficiente para o diagnóstico de osteoporose pediátrica, mesmo na presença de DMO normal (NIH, 2001; MÄKITIE *et al.*, 2005; BISHOP *et al.*, 2014).

Dos fatores que influenciam o risco de osteoporose, comumente observada em indivíduos idosos, podemos citar fatores não-genéticos, como dieta, atividade física, deficiência de estrogênio, uso de medicamentos e doenças coexistentes, mas um dos fatores de risco clínico mais importantes é uma história familiar positiva, enfatizando a importância da genética na patogênese da doença, compatível com um modelo multifatorial (SIGURDSSON *et al.*, 2008). A osteoporose na população jovem é mais comumente um sinal de patologia óssea primária grave (osteoporose primária), embora possa ocorrer em consequência de medicamentos ou outras doenças (osteoporose secundária). A osteoporose primária na população jovem é determinada principalmente por fatores genéticos, enquanto os fatores de estilo de vida têm um papel menor (LAINE & LAINE, 2013).

A identificação de genes em seres humanos associados à fragilidade óssea começou por meio do estudo de doenças monogênicas e, posteriormente, o advento dos estudos de associação de escala genômica (GWAS) expandiu o horizonte da contribuição genética para a osteoporose. Até ao data do presente trabalho, na literatura mais de 20 GWAS foram realizados com o intuito de buscar genes associados com a osteoporose e alguns destes genes como *WLS* e *AXINI* só foram relacionados ao metabolismo ósseo após estes estudos de associação (ROCHA-BRAZ & FERRAZ-DE-SOUZA, 2016).

### 1.3 DOENÇAS MONOGÊNICAS DE RELEVÂNCIA PARA A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E OSTEOPOROSE

O estudo de doenças monogênicas com impacto para a DMO possibilitou a identificação de vários mecanismos fundamentais envolvidos na fisiologia óssea (KARASIK *et al.*, 2016). Segundo a revisão recente de 2023 da Nosologia dos distúrbios esqueléticos genéticos por especialistas, dentre as 771 doenças classificadas em 40 grupos distintos, os grupos 24 a 27 são destinados a enfermidades com aumento ou diminuição da DMO (UNGER *et al.*, 2023).

No grupo 26 temos principalmente a osteogênese imperfeita (OI – OMIM #166200), descrita em detalhes na seção 1.4, que apresenta uma grande heterogeneidade genética de *locus* e a condição mais frequentemente reconhecida como exemplo de doença óssea genética com diminuição da DMO. Outras doenças genéticas mais raras estão incluídas neste grupo, como a síndrome da osteoporose pseudoglioma (OPPG – OMIM #259770) (UNGER *et al.*, 2023).

A OPPG é uma síndrome rara de osteoporose de início juvenil e anormalidades oculares (SARAUX *et al.*, 1967). Em relação aos casos relatados, a maioria dos pacientes apresenta fraturas ósseas após os 2 anos e cegueira congênita (AI *et al.*, 2005). É uma doença com um padrão de herança autossômico recessivo (AR) causada por variantes bialélicas no gene *LRP5* (GONG *et al.*, 2001). Essas variantes impedem a proteína Wnt de se ligar a proteína 5 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP5), com redução da sinalização da via Wingless (Wnt). Os genitores dos pacientes com OPPG, heterozigotos para as variantes, apresentavam diminuição da DMO quando comparados com controles (GONG *et al.*, 2001).

A síndrome de Stüve-Wiedemann (STW – OMIM #601559) é com frequência diagnosticado intraútero pela presença do encurvamento dos ossos longos, o que é observado em doenças com fragilidade óssea, como na OI. A STW foi descrita pela primeira vez em 1971 em uma família com duas irmãs e um primo, cujos achados clínico-radiológicos incluíam baixa estatura, encurvamento dos ossos longos, restrições articulares e achados radiológicos com ossos longos curtos, largos e comprometimento metafisário. Os pacientes evoluíram com insuficiência respiratória e óbito no período neonatal. Um dos pacientes também apresentava dificuldade de deglutição e hipertermia (STÜVE & WIEDEMANN, 1971; WIEDEMANN & STÜVE, 1996).

Embora inicialmente a STW tenha sido considerada uma doença letal, surgiram descrições na literatura de pacientes que sobreviviam pelo menos até o início da adolescência (DI ROCCO *et al.*, 2003; PIZONES *et al.*, 2013). O quadro clínico caracteriza-se pela presença de uma baixa estatura desproporcionada, com deformidades em membros, restrições articulares, sinais de disautonomia (episódios de hipertermia, diminuição da sensibilidade a dor, alacrimia, redução do reflexo corneano, discinesia faringoesofágica, com dificuldade à deglutição). Dentre os achados radiológicos, observam-se ossos longos curtos e encurvados, especialmente em fêmur e tíbia, com um reforço interno da cortical na concavidade do encurvamento ósseo; as metáfises estão alargadas, a densidade óssea diminuída, favorecendo o aparecimento de fraturas ósseas. Pode-se ainda observar sinais de deformidades articulares e escoliose. A maioria dos pacientes apresenta variantes bialélicas em *LIFR*, caracterizando um padrão de herança AR, cujo produto é um receptor de citocina, que se liga a diversos membros da família das interleucinas tipo 6 e atua nas vias de sinalizações Janus Quinase e Transdutor de Sinal/Ativador da Transcrição (JAK/STAT), Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK) e Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). As variantes de perda de função em *LIFR* levam a um comprometimento dessas vias de sinalização, cuja expressão nos diferentes tecidos levará aos achados clínicos da síndrome (ROMEO-BERTOLA *et al.*, 2016; MIKELONIS *et al.*, 2014).

Em alguns indivíduos com achados clínicos e radiológicos típicos da STW, nenhuma variante foi encontrada na região codificadora do gene *LIFR*, sugerindo haver heterogeneidade genética de *locus* nesta síndrome. Este fato se confirmou pela identificação recente de variantes bialélicas no gene *IL6ST*, que codifica a proteína GP130 e forma um complexo com receptores de interleucinas, incluindo *LIFR* (CHEN *et al.*, 2020).

O grupo 27, com mineralização anormal, engloba diferentes formas de raquitismo e a hipofosfatase (UNGER *et al.*, 2023). Na hipofosfatase (OMIM #241500), há uma deficiência da enzima fosfatase alcalina não tecido específica (TNSALP), com acúmulo extracelular de seus substratos, particularmente o pirofosfato inorgânico, um inibidor da mineralização. Como consequência, há uma série de sinais e sintomas acometendo os ossos, dentes e articulações, a depender dos sete diferentes tipos nos quais a hipofosfatase é classificada (NUNES, 2023).

Há uma grande variabilidade de expressão desta doença, desde formas letais intraútero (hipofosfatase perinatal), por ausência de mineralização óssea, até formas leves, sem achados esqueléticos, mas apenas alterações dentárias (forma denominada odonto-hipofosfatase, com perda de um ou mais dentes decíduos antes dos cinco anos de idade, sem dor ou sangramento e com a raiz intacta) e/ou articulares. Na forma do adulto, os indivíduos geralmente apresentam fraturas de estresse do metatarso, com dificuldade de consolidação, pseudofratura femoral na região subtrocantérica e perdas dentárias. Pode haver ainda deposição de compostos de cálcio, pelo acúmulo de pirofosfato inorgânico, em regiões articulares, periarticulares e ligamentos. Na criança, além da forma perinatal, existem as formas pré-natal benigna, que embora possa apresentar manifestações intraútero, ocorre uma melhora dos achados ósseos na evolução; a forma da lactância e da infância, com achados antes e após os seis meses de vida, respectivamente. Na forma da lactância, os achados esqueléticos podem ser acompanhados de um baixo ganho pâncreo-estatural, atraso do desenvolvimento motor/da marcha, craniossinostose, hipercalcemia e hipercalciúria, com vômitos e nefrocalcinose e convulsões por deficiência de piridoxina. Os achados radiológicos característicos incluem metáfises com falhas em sua calcificação e com diáfises normais. Na evolução, fraturas e deformidades ósseas podem ocorrer pela diminuição da mineralização. Já na forma da infância, o quadro clínico varia de leve a grave, mas a perda dos dentes decíduos é quase constante. As imagens radiológicas mostram um aspecto característico da hipofosfatase que seria a presença de áreas de radiolucência da fise se projetando para a metáfise, como uma língua, alargamento metafisário dos ossos longos e nas regiões condrocostais (WHYTE, 2016; NUNES, 2023).

A TNSALP é codificada pelo gene *ALPL*. Embora uma precisa correlação genótipo-fenótipo não esteja estabelecida, indivíduos com variantes em heterozigose, compatível com

um padrão de herança autossômico dominante (AD), apresentam quadros leves, enquanto variantes bialélicas, compatíveis com um padrão de herança AR, são identificadas nas formas graves da hipofosfatase (NUNES, 2023).

## 1.4 OSTEOGÊNESE IMPERFEITA

### 1.4.1 Classificação de acordo com achados clínicos

A OI é considerada uma condição rara, com uma incidência de 1 em 15.000-20.000 nascimentos (FORLINO & MARINI, 2016). De acordo com o Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênicas (ECLAMC), a prevalência da condição na América Latina é de 1:13:500 nascimentos (BARBOSA-BUCK *et al.*, 2012).

Pacientes com OI possuem diminuição da DMO que resulta em susceptibilidade a fraturas ósseas e deformidades dos ossos longos, costelas e coluna vertebral (FORLINO & MARINI, 2016; EL-GAZZAR & HÖGLER, 2021). Um estudo de base populacional na Dinamarca conduzido por Folkestad e colaboradores demonstrou que pacientes com OI têm taxas de fraturas ósseas oito vezes maiores (todos os locais do esqueleto combinados) do que a população geral. Esse trabalho mostrou que o risco de fraturas também variou com a idade, sendo 11 vezes maior em indivíduos com OI abaixo de 20 anos, 6 vezes de 20 a 54 anos e 4 vezes em indivíduos com 55 anos ou mais (FOLKESTAD *et al.*, 2017).

O diagnóstico inicial é amplamente baseado em achados clínicos e radiográficos (SILLENCE *et al.*, 1979). Embora o achado cardinal na OI seja o acometimento ósseo, sinais em outros órgãos e sistemas também podem ser observados, como esclera azulada ou acinzentada, dentinogênese imperfeita (DI), deficiência auditiva ou frouxidão articular, com expressividade variável (FORLINO & MARINI, 2016; EL-GAZZAR & HÖGLER, 2021). Em 1979, a OI foi classificada em quatro subtipos de acordo com a gravidade clínica, variando de leve a letal, por David Silience (SILLENCE *et al.*, 1979). Os tipos I a IV de Silience são normalmente considerados como OI clássica e foi adicionado um quinto tipo clínico (OI tipo V) em 2015 (BONAFE *et al.*, 2015). Alguns tipos podem ser diagnosticados no período pré-natal, enquanto outros só se tornam aparente ao nascimento ou na primeira infância (MARINI *et al.*, 2017).

Pacientes com OI tipo I têm uma forma distintamente mais leve da doença, que geralmente não é detectável ao nascimento. Os pacientes podem ter sua primeira fratura nos anos pré-escolares, por exemplo, ao iniciar a deambulação. Eles também podem ter uma série

de fraturas nos anos pré-púberes devido a traumas leves. As fraturas geralmente diminuem drasticamente após a puberdade. Pacientes com OI tipo I têm osso normalmente modelado e podem apresentar leve arqueamento dos ossos longos e mínimas compressões vertebrais centrais. Eles geralmente são alguns centímetros mais baixos do que parentes do mesmo sexo. A mobilidade está limitada a uma maior vulnerabilidade a fraturas ósseas, sem comprometimento na expectativa de vida. A tonalidade azul da esclera está presente na maioria dos casos (MARINI & DANG DO, 2020).

Já no tipo II, os pacientes raramente sobrevivem após um ano de idade, indo a óbito no período pré-natal ou perinatal por insuficiência respiratória devido à extrema fragilidade das costelas e hipoplasia pulmonar ou malformação ou hemorragia do sistema nervoso central (SHAPIRO *et al.*, 1989). Os membros, especialmente as pernas, são curtos, com deformidades graves. Na maioria das vezes, as pernas são abduzidas na clássica “posição da perna de sapo”. O exame radiográfico revela múltiplas fraturas intraútero (MARINI & DANG DO, 2020).

A OI tipo III, também conhecida como tipo deformante progressivo (SILLENCE *et al.*, 1986), é a forma mais grave de OI compatível com a sobrevivência além da infância e é gravemente incapacitante. Complicações respiratórias ou neurológicas, seja durante a infância ou no início da idade adulta, podem comprometer a expectativa de vida dos indivíduos com OI tipo III (MARINI & DANG DO, 2020).

Os pacientes do tipo IV apresentam coloração normal da esclera e gravidade intermediária da fragilidade óssea. A presença ou ausência de DI é usada para classificar os grupos em A e B. Problemas dentários incluindo DI ou prognatismo são comuns e podem necessitar de atendimento odontológico por especialistas em OI (VAN DIJK & SILLENCE, 2014). Já a OI tipo V compreende aproximadamente 15-20% dos indivíduos que têm um fenótipo característico de OI. Eles não apresentam DI e nem esclera azulada. Além disso, apresentam calos hiperplásicos e calcificação das membranas interósseas (MARINI & DANG DO, 2020). O **quadro 2** resume essas classificações.

**Quadro 2** - Classificação clínica da OI de acordo com Silience e colaboradores proposta em 1979 com quinto tipo adicionado em 2015

<b>Classificação</b>	<b>Características clínicas</b>
<b>Tipo I</b>	Esclera azulada, estatura próxima da normal, perda auditiva de início tardio, mas sem DI aparente
<b>Tipo II</b>	Forma perinatal letal
<b>Tipo III</b>	Deformidade óssea progressiva

<b>Tipo IV</b>	Esclera branca, baixa estatura, deformidade óssea e DI (mais grave do que o tipo I, mas menos grave que tipos II e III)
<b>Tipo V</b>	Com anormalidades de calcificação progressiva (membrana interóssea)

DI: dentinogênese imperfeita

Fonte: adaptado de MARINI *et al.*, 2017

#### 1.4.2 Manejo clínico dos pacientes

O médico costuma ser o primeiro ponto de contato para a avaliação de pacientes com OI e ele tem o papel de identificar corretamente a condição e excluir outras doenças ósseas metabólicas resultando em fragilidade óssea, tais como raquitismo, osteoporose juvenil idiopática, hipofosfatasia, e outras condições raras (MARR *et al.*, 2017).

O tratamento da OI é principalmente de suporte e sintomático e é adaptado ao paciente com base em sua idade, tipo e gravidade, englobando tratamentos ortopédico, dentário, para perda auditiva além de farmacológico, portanto, é multidisciplinar (MAROM *et al.*, 2020).

O manejo da fratura óssea é a base da intervenção ortopédica em crianças e adultos jovens com OI (RAUCH & GLORIEUX, 2004). A maioria das fraturas pode ser tratada com gesso ou cirurgia, mas algumas deixam deformidades nos membros. Em 1959, Sofield e Millar revolucionaram o tratamento de deformidades e fraturas de ossos longos em pacientes com OI, realizando diversas osteotomias em segmentos deformados. Isso permitiu realinhar os fragmentos e estabilizá-los com a ajuda de uma haste intramedular. Com esta técnica, o prognóstico melhorou significativamente e o uso de hastes intramedulares nos ossos longos tem sido empregado atualmente com sucesso com o objetivo de estabilizar fraturas graves, auxiliar na correção de deformidades ou evitar fraturas recorrentes (KHOSHHAL & ELLIS, 2001).

Além da dificuldade no diagnóstico, risco de fraturas ósseas recorrentes e outras complicações, desafios reprodutivos também são enfrentados por membros de famílias com OI, decorrentes de um risco de recorrência aumentado em relação à população geral a depender do padrão de herança (ZHYTNIK *et al.*, 2020). Mais da metade dos indivíduos com OI de herança AD têm uma história familiar de OI, com risco para a prole de 50% nos indivíduos com variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em heterozigose em *COL1A1*, *COL1A2* ou *IFITM5*. No entanto, há uma proporção de indivíduos que pode apresentar um mosaicismos, seja gonadal ou somático, com ausência de sinais ou sinais leves. Nestes casos, há risco de transmitirem o alelo com a variante para seus descendentes que podem apresentar quadros graves e até mesmo letais de OI. Pela possibilidade de um mosaicismos em um dos genitores, o

que é muitas vezes difícil de ser detectado na prática clínica, o risco de recorrência para a prole de um casal com um caso aparentemente isolado na família, é considerado empiricamente entre 5-10% (ZHYTNIK *et al.*, 2020; MARINI & DANG DO, 2020). Nos casos de OI de herança autossômica recessiva, o risco de recorrência para um casal com filho (a) com diagnóstico prévio é de 25%. Portanto, o aconselhamento genético é um componente essencial do cuidado completo para indivíduos com OI e familiares (ZHYTNIK *et al.*, 2020; MARINI & DANG, 2020).

### 1.4.3 Tratamento medicamentoso para pacientes

Até o momento, não existe uma terapia específica que possa restaurar com eficácia o processamento do colágeno defeituoso (EL-GAZZAR & HÖGLER, 2021). O tratamento médico da OI se baseia atualmente na administração de medicamentos usados para tratar a osteoporose, partindo do pressuposto de que medicamentos que aumentam a DMO podem influenciar favoravelmente o resultado clínico e reduzir o risco de fraturas (RALSTON & GASTON, 2019).

Uma associação com terapia antirreabsortiva, particularmente a classe dos bisfosfonatos, fisioterapia intensiva e fortalecimento muscular continua sendo a abordagem de tratamento médico comum em crianças e adultos com OI, visando a maior independência possível destes pacientes (EL-GAZZAR & HÖGLER, 2021).

De acordo com os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) da OI aprovados pelo Ministério da Saúde, por meio da Portaria SAS/MS nº 1.306, de 2013, o tratamento medicamentoso recomendado no Brasil para crianças e adultos com diagnóstico clínico deve ser feito com bisfosfonatos.

Outras opções terapêuticas direcionadas para vias de sinalização importantes para a mineralização/formação óssea, têm sido desenvolvidos no mundo. O **quadro 3** traz os agentes terapêuticos utilizados e em desenvolvimento para prevenir fraturas em pacientes com OI. O anticorpo neutralizante contra esclerostina (Scl-AB), uma molécula produzida por osteócitos para inibir a formação óssea mediada por osteoblastos, através da cascata de sinalização Wnt, aumentou a taxa de formação óssea e a massa óssea em um modelo de camundongo de OI. Atualmente, o denosumabe, um anticorpo monoclonal contra o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), que inibe a atividade osteoclástica, está sendo testado em ensaios clínicos em pacientes com OI (RALSTON & GASTON, 2019).

**Quadro 3** - Agentes terapêuticos para prevenir fraturas em pacientes com OI

<b>Agente terapêutico</b>	<b>Modo de administração</b>	<b>Mecanismo de ação sugerido</b>	<b>Observações</b>
<b>Bisfosfonatos (Pamidronato, Alendronato, Risdronato, Ácido zoledrônico)</b>	Infusão EV ou via oral a depender da medicação	Antirreabsortivo, inibição da atividade dos osteoclastos	Pilar da terapia de OI
<b>Denosumabe</b>	Injeção subcutânea	Antirreabsortivo, anticorpo anti-RANKL, inibição da atividade osteoclástica	Em ensaio clínico
<b>Teriparatida</b>	Injeção subcutânea	Anabólico, PTH recombinante humano, PTH (1-34)	Terapia limitada a 24 meses, não aprovada para uso em crianças
<b>Anticorpo anti-esclerostina (Romosozumabe, Blosozumabe)</b>	Injeção subcutânea ou infusão EV	Anabólico, anti-esclerostina (um inibidor da formação óssea)	Em ensaio clínico
<b>Anticorpo inibidor de TGF-<math>\beta</math> (Fresolimumabe)</b>	Infusão EV	Visa a sinalização excessiva de TGF- $\beta$ no osso	Em ensaio clínico

EV: endovenosa; PTH: paratormônio; TGF- $\beta$ : Fator de transformação do crescimento beta  
 Fonte: MAROM *et al.*, 2020.

#### 1.4.4 Genes envolvidos

Variantes em heterozigose nos genes *COL1A1* ou *COL1A2* são identificadas na grande maioria dos pacientes com OI; estima-se que 85-90% dos casos de OI sejam causados por alterações em um desses dois genes (MARINI & DANG DO, 2020). O colágeno tipo I pertence a uma grande e diversificada família de colágenos que estão presentes em todo o corpo. Os colágenos são caracterizados por uma hélice tripla de cadeias polipeptídicas ( $\alpha$ ); o colágeno tipo I é uma molécula heterotrimérica, formada por duas cadeias alfa 1, codificada por *COL1A1*, e uma cadeia alfa 2, codificada por *COL1A2* (CLAEYS *et al.*, 2021).

A produção de colágeno envolve um processo complexo, a partir da produção das cadeias de colágeno I $\alpha$ 1 e I $\alpha$ 2 no retículo endoplasmático, durante e após o qual o pró-colágeno é submetido a uma infinidade de modificações pós-traducionais por chaperonas. Após atingir o complexo de Golgi, o pró-colágeno é destinado à matriz extracelular onde forma fibrilas de colágeno (CLAEYS *et al.*, 2021).

Duas classes gerais de variantes, com consequências diferentes na proteína codificada, estão associadas à OI. A primeira classe de variantes, cujo mecanismo de patogenicidade é a haploinsuficiência, é geralmente a consequência de uma variante *nonsense* ou do tipo *frameshift* que introduz um códon de parada prematuro na sequência codificadora de um alelo *COL1A1/COL1A2*, promovendo o decaimento do RNA mensageiro (mRNA) mediado por variantes *nonsense* (NMD). O resultado dessas variantes é um defeito quantitativo no colágeno tipo I, pois apenas cerca de metade da quantidade normal da proteína é produzida. Algumas variantes no sítio de *splicing* e no propeptídeo C em *COL1A1/COL1A2* também podem levar à haploinsuficiência. No entanto, a proteína de colágeno tipo I produzida tem uma estrutura normal. Esta classe de variantes normalmente resulta em OI leve tipo I (JOVANOVIC *et al.*, 2022).

A segunda classe consiste em mudanças na sequência que levam a alterações estruturais no colágeno tipo I (defeito qualitativo). Isso inclui variantes do tipo *missense*, em 80% dos casos com substituição de uma das glicinas localizada na tripla hélice por outro aminoácido, o tipo mais frequente de alterações que levam a OI. O mecanismo de patogenicidade dessas variantes é conhecido como efeito dominante negativo, uma vez que a cadeia alterada formada é incorporada, exercendo um efeito deletério sobre o produto normal do outro alelo. Qualquer variante que altere a sequência Gly-X-Y da tripla hélice do colágeno resultará em função do colágeno prejudicada. Essas variantes prejudicam a formação da tripla hélice, sua estabilidade e suas interações com a matriz extracelular. Muitos poucos monômeros de colágeno alterados são necessários para interromper a estrutura dos vários conjuntos de multitrímeros (JOVANOVIC *et al.*, 2022; MARINI & DANG DO, 2020).

Apesar de diversos casos apresentarem variantes em *COL1A1* e *COL1A2*, variantes em diversos genes ligados à herança AR e, um gene à herança ligada ao cromossomo X, foram identificadas em uma porcentagem pequena de pacientes depois de 2006 (EL-GAZZAR & HÖGLER, 2021). Portanto, o entendimento da base genética da OI levou a duas novas abordagens para classificação: uma com base mais clínica, em que as novas formas com um padrão de herança recessivo são colocadas sob o guarda-chuva clínico do tipo Sillence, ou uma abordagem genético-funcional, em que os tipos I-IV da classificação de Sillence são reservados para variantes em *COL1A1* ou *COL1A2* e novos genes recebem números adicionais, sem correlação clínica (MARINI *et al.*, 2017). Para cada gene recém-descoberto é listado um novo tipo de OI no OMIM (TAUER *et al.*, 2019). O **quadro 4** mostra as categorias de OI reportadas no OMIM.

**Quadro 4 -** Classificação dos diferentes tipos de OI no banco de dados do OMIM, levando-se em consideração o gene responsável e o padrão de herança

<b>Tipo de OI</b>	<b>Gene</b>	<b>Localização cromossômica</b>	<b>OMIM #</b>	<b>Herança</b>
<b>I</b>	<i>COL1A1 , COL1A2</i>	17q21.33, 7q21.3	166200	AD
<b>II</b>	<i>COL1A1 , COL1A2</i>	17q21.33, 7q21.3	166210	AD
<b>III</b>	<i>COL1A1 , COL1A2</i>	17q21.33, 7q21.3	259420	AD
<b>IV</b>	<i>COL1A1 , COL1A2</i>	17q21.33, 7q21.3	166220	AD
<b>V</b>	<i>IFITM5</i>	11p15.5	610967	AD
<b>VI</b>	<i>SERPINF1</i>	17p13.3	613982	AR
<b>VII</b>	<i>CRTAP</i>	3p22.3	610682	AR
<b>VIII</b>	<i>P3H1</i>	1p34.2	610915	AR
<b>IX</b>	<i>PPIB</i>	15q22.31	259440	AR
<b>X</b>	<i>SERPINH1</i>	11q13.5	613848	AR
<b>XI</b>	<i>FKBP10</i>	17q21.2	610968	AR
<b>XII</b>	<i>SP7</i>	12q13.13	613849	AR
<b>XIII</b>	<i>BMP1</i>	8p21.3	614856	AR
<b>XIV</b>	<i>TMEM38B</i>	9q31.2	615066	AR
<b>XV</b>	<i>WNT1</i>	12q13.12	615220	AR
<b>XVI</b>	<i>CREB3L1</i>	11p11.2	616229	AR
<b>XVII</b>	<i>SPARC</i>	5q33.1	616507	AR
<b>XVIII</b>	<i>TENT5A</i>	6q14.1	617952	AR
<b>XIX</b>	<i>MBTPS2</i>	Xp22.12	301014	XLR
<b>XX</b>	<i>MESD</i>	15q25.1	618644	AR
<b>XXI</b>	<i>KDEL2</i>	7p22.1	609024	AR
<b>XXII</b>	<i>CCDC134</i>	22q13.2	619795	AR

O gene mais recente associado a OI foi descrito em 2020 por Dubail e colaboradores (DUBAIL *et al.*, 2020). Por sequenciamento completo do exoma, os pesquisadores identificaram uma variante em homozigose na metionina inicial (c.2T>C) em *CCDC134* em três pacientes de origem marroquina de duas famílias com história de consanguinidade entre seus genitores e não-aparentadas entre si. Eles apresentavam fragilidade óssea grave, progressivamente deformante, classificada como tipo III (pela classificação de Silience), sem resposta satisfatória ao tratamento com bisfosfonato, baixa estatura e ossos longos com pseudoartroses, mas sem DI. *CCDC134* codifica uma proteína secretada amplamente expressa e implicada na regulação da via de sinalização MAPK. Por meio de experimentos funcionais,

os autores sugeriram que o mecanismo de patogenicidade da variante em homozigose era de perda de função (DUBAIL *et al.*, 2020).

Diversos genes descritos associados à OI têm em comum o fato de, por vários mecanismos, afetarem a qualidade ou quantidade do colágeno tipo I. Vários desses produtos gênicos comprometem o processamento e as ligações cruzadas intermoleculares do colágeno ou produzem modificações pós-traducionais anormais. Já outros atuam na própria mineralização óssea ou interferem na diferenciação e função dos osteoblastos, pertencentes a diferentes vias de sinalização (JOVANOVIC *et al.*, 2022). Em 2016, Forlino e Marini propuseram classificar a OI a partir dos achados moleculares e a função desempenhada por esses genes (FORLINO & MARINI, 2016). Os autores sugeriram cinco grupos de subtipos para OI (Grupos A – E):

- Grupo A (tipos I – IV, XIII): defeitos na síntese de colágeno, estrutura ou processamento de *COL1A1* e *COL1A2*, incluindo sua clivagem de propeptídeo C-terminal por *BMP1*.
- Grupo B (tipos VII, VIII, IX e XIV): genes que desempenham um papel fundamental na modificação pós-traducional do colágeno tipo I, que são *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB* e *TMEM38B*.
- Grupo C (tipos X, XI): genes responsáveis pelo dobramento ou ligações cruzadas do colágeno, que são *SERPINH1*, *FKBP10*, *PLOD2* e *P4HB*.
- Grupo D (tipos V e VI): genes *IFITM5* e *SERPINF1* que modificam a mineralização óssea.
- Grupo E (tipos XII, XV, XVI): genes que causam defeitos na diferenciação dos osteoblastos, que são *SP7*, *WNT1* e *CREB3L1*.

#### **1.4.5 Estudos genéticos de grupos de pacientes com osteogênese imperfeita no Brasil**

Até a data do presente trabalho, os estudos realizados em grupos de pacientes brasileiros com OI são escassos e variam de acordo com os critérios clínicos de inclusão, os genes estudados e as técnicas aplicadas. O primeiro estudo molecular realizado em nosso meio avaliou apenas o gene *COL1A1* por sequenciamento Sanger em 13 pacientes recrutados de diferentes Estados diagnosticados como portadores de OI tipos I, II, III ou IV, de acordo com a classificação de Sillence. Seis variantes diferentes no gene *COL1A1* foram identificadas, cinco

delas eram de pacientes não aparentados e uma delas em um caso familiar, com uma taxa de positividade de 46,15% (6/13) (REIS *et al.*, 2005).

Em 2015, Brizola e colaboradores avaliaram a variante recorrente c.-14C>T em *IFITM5* em 37 pacientes OI tipo V, encontrando uma positividade de 18,91% (7/37) (BRIZOLA *et al.*, 2015).

A análise de grupos de genes associados a formas autossômicas recessivas de OI foi realizada inicialmente por Barbirato e colaboradores em 2015 e 2016, também utilizando a técnica de Sanger, com triagem prévia por *single-strand conformation polymorphism* (SSCP). Em dois trabalhos com a análise de genes distintos (*LEPRE*, *CRTAP*, *PPIB* e *FKBP10*, *SERPINH1*, *SERPINF1*) a positividade foi de 28% (7/25) e 39,13% (9/23), respectivamente (BARBIRATO *et al.*, 2015; BARBIRATO *et al.*, 2016).

Trancozo e colaboradores (2019) analisaram 30 pacientes não aparentados por meio de triagem SSCP, painel de genes por NGS e/ou sequenciamento Sanger para os 11 genes mais frequentemente encontrados no banco de dados de mutações de OI (*COLIA1*, *COLIA2*, *P3H1*, *CRTAP*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *WNT1* e *IFITM5*). Neste estudo, metade da casuística já havia sido estudada por Barbirato e colaboradores em 2015 e 2016. Embora algumas variantes tenham sido encontradas em alguns dos genes associados a formas de OI recessivas, diversas dessas variantes foram consideradas como polimorfismos. A maioria dos pacientes apresentava variantes em *COLIA1* (14 indivíduos) e *COLIA2* (9 indivíduos) (TRANCOZO *et al.*, 2019).

A técnica de NGS também foi empregada no estudo de 38 pacientes com OI, oito deles casos familiares com avaliação de um painel contemplando 15 genes (*COLIA1*, *COLIA2*, *IFITM5* (5'UTR), *SERPINF1*, *CRTAP*, *P3H1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10*, *PLOD2*, *BMP1*, *SP7*, *TMEM38B*, *WNT1*, *CREB3L1*) por Fernandes e colaboradores (2020). Variantes patogênicas foram identificadas em 97% (37/38 indivíduos) dos casos de OI, sendo que pacientes com variantes *COLIA1/COLIA2* corresponderam a 71%, enquanto 26% tinham variantes em outros genes, predominantemente *FKBP10*, *PLOD2* e *SERPINF1*. Uma possível interação digênica envolvendo *P3H1* e *WNT1* também foi apontada (FERNANDES *et al.*, 2020).

O estudo mais recente consistiu na avaliação de 156 pacientes e a análise molecular resultou conclusiva para 121 indivíduos. Foi utilizado um painel customizado de 18 genes associados à OI (*COLIA1*, *COLIA2*, *CRTAP*, *P3H1*, *PPIB*, *WNT1*, *TMEM38B*, *SERPINH1*, *BMP1*, *SP7*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SMPD3*, *CREB3L1*, *PLOD2*, *P4HB*, *PLS3* e *IFITM5* (5'UTR)). O fenótipo dos 121 com diagnóstico molecular foi descrito como leve em 27,8%

(n=34); letal em 0,9% (n=1); grave em 36,5% (n=44); moderado em 34,8% (n=42). Quase 90% dos indivíduos apresentavam variantes em *COL1A1* /2. Variantes em genes relacionados a OI-AR foram identificadas em 11,6% dos participantes (HOLTZ *et al.*, 2023).

### 1.5 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) E DISPLASIAS ESQUELÉTICAS

As tecnologias de sequenciamento de DNA têm desempenhado papéis importantes na biologia molecular na área de pesquisa e nos testes diagnósticos na aplicação clínica. A plataforma de primeira geração, sequenciamento de Sanger, foi desenvolvida por Fred Sanger em 1977 e tem sido usada por décadas em pesquisa e genética clínica (ZHONG *et al.*, 2021). Três décadas depois, o sequenciamento de nova geração (NGS) ou sequenciamento massivo paralelo, um método de sequenciamento simultâneo de milhões de fragmentos de DNA (ou DNA complementar), foi rapidamente adotado no laboratório clínico devido à sua capacidade de analisar simultaneamente vários genes ou regiões gênicas com um teste único em comparação com os métodos tradicionais (YOHE & THYAGARAJAN, 2017).

Várias tecnologias de NGS foram desenvolvidas por diferentes empresas comerciais. Em geral, os fluxos de trabalho dessas diferentes tecnologias de sequenciamento incluem as etapas: (1) preparação do *template* incluindo extração de ácido nucleico; (2) preparação de biblioteca incluindo amplificação clonal; e (3) sequenciamento e alinhamento de leituras curtas; (4) análise e interpretação de variantes/alterações (ZHONG *et al.*, 2021). O NGS pode ser aplicado como um painel que contemple genes direcionados para um fenótipo/condição, como o sequenciamento do exoma (sequenciamento dos éxons de todos os genes, com suas regiões flangeadoras), genoma completo ou sequenciamento de DNA mitocondrial (PLATT *et al.*, 2014; YOHE & THYAGARAJAN, 2017).

No caso da OI, considerando os numerosos genes associados à esta doença óssea (heterogeneidade genética de *loci*) e sua similaridade fenotípica, estratégias distintas podem ser empregadas para a confirmação diagnóstica, seja com o emprego sequencial dos genes mais prevalentes (*COL1A1* e *COL1A2*), seguidos dos genes responsáveis por formas mais raras de OI, na forma de um painel de genes; seja direcionado para um fenótipo específico, como o sequenciamento da variante recorrente em *IFITM5* ou seja no sequenciamento do exoma, englobando a análise de todos os genes associados à OI e diagnósticos diferenciais (STEINER & BASEL, 2021).

Um trabalho avaliando uma casuística grande, com 598 pacientes, foi realizado por BARDAI e colaboradores (2016). A população do estudo compreendeu todos os indivíduos

com um fenótipo típico de OI que foram avaliados no *Shriners Hospital for Children* em Montreal entre dezembro de 2000 e fevereiro de 2015. Os 598 indivíduos residiam em diversos países e regiões geográficas: Canadá (n=370), EUA (n=154), América Latina (n=44), Europa (n=16), Oriente Médio (n=10) e outros (n=4). Em relação a clínica, a OI tipo I foi diagnosticada em 43% da população do estudo, e 57% foram classificados como tendo um dos tipos de OI moderada a grave. O sequenciamento de Sanger foi realizado como metodologia diagnóstica inicial; variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas foram encontradas em 483 desses indivíduos (93%). Com a aplicação da técnica de NGS, por um painel customizado, a taxa de positividade geral do estudo foi de 97%. Especificamente, variantes causadoras de doenças foram detectadas em 97% dos indivíduos com OI tipo I e em 99% dos pacientes com OI moderada a grave. Na OI moderada a grave, foram encontradas variantes em um dos genes associados à OI-AR em 40 indivíduos (BARDAI *et al.*, 2016).

Espera-se que as formas AR de OI sejam mais comuns em populações que apresentam uma taxa maior de consanguinidade. Por exemplo, ESSAWI e colaboradores (2018) realizaram o estudo molecular, por um painel customizado através da técnica de NGS, de 49 famílias palestinas, 32 destas (65%) consanguíneas, e observaram que as formas AR de OI eram as mais prevalentes (>60%) (ESSAWI *et al.*, 2018). Umair e colaboradores (2016) avaliaram alguns pacientes com OI grave em três famílias consanguíneas e observaram a presença de variantes bialélicas no gene *FKBP10* (UMAIR *et al.*, 2016). Estes achados enfatizam a importância da análise genética dos genes AR na OI, particularmente nessas populações e podem revelar variantes mais frequentes nesses grupos. Além disso, os vários genes identificados associados a formas recessivas em famílias consanguíneas revelaram novos mecanismos patogênicos/vias de sinalização.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características clínico-radiológicas e as bases moleculares de um grupo de indivíduos com diminuição da DMO, particularmente com o diagnóstico clínico de OI grave.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar variantes em genes já reconhecidamente ligados a doenças genéticas com anomalias de DMO, principalmente associados a OI.
- Nos casos inconclusivos ou negativos, avaliar variantes em genes ainda não associados a este fenótipo ósseo pertencentes a vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento ósseo (Wnt e RANKL).
- Estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo em pacientes com OI.
- Realizar o levantamento dos dados moleculares de indivíduos brasileiros com OI.
- Realizar o aconselhamento genético em indivíduos com diminuição da DMO.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 APROVAÇÃO ÉTICA

Este estudo é um subprojeto do “Estudo genético-clínico das displasias esqueléticas” aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) – processo nº0558/10 e contemplado na Plataforma Brasil CAAE: 86055518.1.0000.0068.

##### 3.1.1 Critérios de inclusão no estudo

Os pacientes foram avaliados no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr/HC-FMUSP) entre os anos de 2010 até 2022 no ambulatório de Genética Geral e, mais recentemente, em um ambulatório específico para doenças genéticas ósseas da Unidade de Genética coordenado pela orientadora deste estudo. Exceto os pacientes F29, avaliado em serviço externo, e F20, cujo estudo molecular foi realizado no Laboratório DASA, todos os demais foram avaliados neste Centro. Para a participação no estudo, foram estabelecidos os seguintes critérios:

- Indivíduos com hipótese clínico-radiológica de OI moderada/grave/letal (anomalias detectadas pela ultrassonografia fetal ou fraturas recorrentes com deformidades ósseas no pós-natal), com ou sem presença de consanguinidade entre os pais.
- Indivíduos com diminuição da DMO, com hipóteses clínicas de outras doenças raras contempladas nos grupos 26 (grupo da OI e doenças com fragilidade óssea), 27 (doenças de mineralização óssea) e 20 (grupo das displasias com encurvamentos ósseos) da Nosologia de Doenças Ósseas Genéticas (UNGER *et al.*, 2023).
- Aceite em participar do estudo e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido/Assentimento, conforme a idade do participante.

#### 3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foi realizada uma anamnese, exame físico completo e heredograma. A realização de uma radiografia completa do esqueleto foi feita no setor de Radiologia do ICr/HC-FMUSP ou no setor de Radiologia do Instituto Central/HC-FMUSP. Outros exames complementares foram solicitados quando da presença de algum sinal/sintoma que necessitasse de uma investigação

complementar. Os indivíduos com diagnóstico clínico-radiológico compatível com OI foram classificados pelas categorias estabelecidas por Silience e colaboradores (SILLENCE *et al.*, 1979) e incluídos aqueles classificados nos grupos graves, II, III e IV, constituindo a maioria da casuística. Indivíduos portadores de outras doenças mais raras com alteração da DMO incluídos foram aqueles com diagnósticos clínico-radiológicos de OPPG, STW e hipofosfatase. No total a casuística foi composta de 43 indivíduos (destes, 32 probandos).

### 3.3 AVALIAÇÃO GENÉTICA DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Os probandos foram submetidos à análise molecular pela técnica de NGS por um painel de genes que contemplavam aqueles associados a fenótipos mendelianos com anormalidades da DMO e outros por sequenciamento completo do exoma realizados no Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL/IB-USP). Os critérios para escolha de qual teste genético realizar inicialmente em cada paciente da casuística de doenças ósseas genéticas visaram à maior probabilidade de diagnóstico com o menor custo e disponibilidade de exame.

Ao longo dos anos, diferentes painéis customizados (P1 a P4 – anexos I-IV) foram elaborados e depois substituídos pelos comerciais. Nos painéis customizados, a seleção dos genes levou em consideração os diagnósticos mais prevalentes das doenças ósseas genéticas no ambulatório de Genética Médica do ICr-HC-FMUSP e seus diagnósticos diferenciais, à luz da classificação das doenças ósseas genéticas adotada na época (WARMAN *et al.*, 2011). Eles foram associados a outros genes responsáveis por outras condições de interesse em pesquisa do laboratório, como transtorno do espectro autista, distúrbios neuromusculares e síndromes com anomalias craniofaciais. Dentre os genes associados às doenças ósseas com alteração da densidade óssea, destacam-se os genes *COL1A1*, *COL1A2*, *CRTAP*, *FKBP10*, *P3H1*, *SERPINH1*, *SP7*, *PPIB*, *ALPL*, *LRP5* e *LIFR* contemplados nos primeiros painéis. Os painéis comerciais da Illumina utilizados (*TruSight One* e *TruSight One TSO expanded*) continham 4813 ou 6700 genes associados a fenótipos mendelianos, respectivamente.

Naqueles pacientes nos quais o painel não mostrou a presença de variantes raras nos genes reconhecidamente associados a um fenótipo mendeliano associados à OI ou outra doença monogênica com anomalia de densidade óssea, foi realizado o sequenciamento do exoma priorizando variantes nos genes das vias de sinalização WNT (151 genes) e RANKL (89 genes) (anexos VII e VIII), de acordo com os genes dispostos na plataforma *Kyoto Encyclopedia of*

*Genes and Genomes* (Kegg Pathway: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), de preferência com os genitores (sequenciamento de exoma de trio).

Para o probando F26.1, filho de pais consanguíneos, não foi possível a coleta de amostra biológica para teste genético em virtude de que este foi a óbito 15 minutos após o nascimento. Porém, as imagens radiológicas eram compatíveis com o diagnóstico de OI e o material biológico dos genitores (F26.2 e F26.3) foi coletado para o estudo de genes relacionados a OI-AR. Para o probando F27, não foi possível realizar outro teste molecular além do painel customizado e seus genitores não estavam disponíveis. No caso familiar (F11.1 a F11.7), a segregação da variante encontrada em F11.1 pelo painel customizado foi realizada por sequenciamento de Sanger nos familiares com o fenótipo de OI. A mesma técnica foi empregada para a segregação da variante nos genitores de F30.1 (F30.2 e F30.3). O **quadro 5** mostra o teste molecular realizado no CEGH-CEL/IB-USP, paciente e hipótese clínica.

#### **Quadro 5 - Teste molecular realizado no CEGH-CEL/IB-USP**

<b>Teste molecular realizado</b>	<b>Probando ou familiar</b>
<b>Painel 1</b>	F30.1; F31; F32
<b>Painel 2</b>	F10; F14
<b>Painel 3</b>	F13; F25; F11.1; F11.5; F27
<b>Painel 4</b>	F22
<b>Painel expandido 4800 genes</b>	F2
<b>Painel ampliado 6700 genes</b>	F3; F16; F8; F23.1; F29
<b>Exoma</b>	F1; F4.1; F4.2; F4.3; F5; F6; F7; F9; F12; F15; F17; F18; F19; F20; F21; F23.2; F24; F26.2; F26.3; F28
<b>Sanger</b>	F11.2; F11.3; F11.4; F11.6; F11.7; F30.2; F30.3

#### **3.3.1 Fluxo de trabalho envolvendo painéis e exoma**

Os fluxos de trabalho das diferentes técnicas de sequenciamento incluem as etapas: (1) preparação do *template* incluindo extração de ácido nucleico; (2) preparação de biblioteca incluindo amplificação clonal; e (3) sequenciamento e alinhamento de leituras curtas; (4) análise e interpretação de variantes/alterações.

Para a extração de DNA, uma amostra de 4 mL de sangue total foi obtida por punção de uma veia periférica no setor de coleta do ICr-HCFMUSP ou durante a internação em uma das enfermarias/berçários do HC-FMUSP em tubo contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA). A extração do DNA a partir dos leucócitos foi realizada por meio de um robô *QIAasymphony* (Qiagen, Alemanha), com o kit de extração de DNA do próprio fabricante. O DNA é extraído direto do tubo primário de sangue periférico de forma automatizada. Todo o processo é monitorado por pontos de verificação por código de barras automatizados e fechado, impossibilitando erros. As amostras foram checadas em relação a sua concentração e pureza no NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) e todas apresentaram valores de 260/280 nanômetros (nm) superiores a 1.8.

Para os painéis foi realizado o NGS em equipamento *Illumina MiSeq* (Illumina, Estados Unidos), utilizando-se diferentes kits de captura e preparo de biblioteca. Tanto o P1 como o P2 foram realizados utilizando o kit *Illumina TruSeq custom enrichment*, que necessita de 1µg de DNA inicial e fragmentação via ultrassom com uso de sonicador Covaris (Covaris, Inc., Woburn, Massachusetts, Estados Unidos). Posteriormente, em 2014 e 2015, o painel de genes foi revisado e a tecnologia de preparo de biblioteca e captura foi atualizada para o kit *Illumina Nextera Rapid Capture Custom Enrichment*, que demanda menor quantidade de DNA inicial (50ng) e possibilita fragmentação direta por método enzimático, prescindindo do sonicador. Para os painéis P3 e P4 foi utilizado o kit *Illumina Nextera Rapid Capture Custom Enrichment* e *Illumina Trusight One Expanded* para o painel TSO expanded), de acordo com o protocolo do próprio fabricante. Já para o sequenciamento do exoma, foi utilizado o equipamento *Illumina HiSeq2000* (Illumina, Estados Unidos) e o kit de captura *Agilent SureSelect Human All Exon V6* (Agilent Technologies, Estados Unidos).

### 3.3.2 Análise dos resultados dos painéis e exoma

As etapas de alinhamento, processamento dos dados, chamada e anotação de variantes foram realizadas utilizando-se os algoritmos e *softwares*: *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA), *Picard* (Broad Institute), *Genome Analysis Toolkit package* (GATK) (Broad Institute) e ANNOVAR. Inicialmente, todas as variantes consideradas raras, com frequência alélica menor que 1% nos bancos de dados populacionais *Genome Aggregation Database* (GnomAD: <https://gnomad.broadinstitute.org>) e Arquivo Brasileiro Online de Mutações (AbraOM: <https://abraom.ib.usp.br/>) foram avaliadas. GnomAD é uma plataforma contendo dados de sequenciamentos de exoma e genoma de uma grande variedade de projetos de sequenciamento

em larga escala. ABraOM contém variantes genômicas obtidas com o sequenciamento do exoma e do genoma completo de uma amostra baseada no censo de idosos de São Paulo, considerada representativa da população miscigenada brasileira.

As variantes presentes nas regiões codificadoras ou sítio de *splicing* canônicos dos genes, não-sinônimas, foram priorizadas. A avaliação dos efeitos funcionais ou de *splicing* previstos das variantes identificadas foi realizada com várias ferramentas *in silico*, incluindo *Rare Exome Variant Ensemble Learner* (REVEL) para variantes do tipo *missense*, Mutation Taster (<https://www.mutationtaster.org>) para variantes de perda de função e SpliceAI para variantes com possível efeito no *splicing*. REVEL é um método de conjunto para prever a patogenicidade de variantes *missense* com base em uma combinação de pontuações de 13 ferramentas individuais: MutPred, FATHMM v2.3, VEST 3.0, PolyPhen-2, SIFT, PROVEAN, MutationAssessor, MutationTaster, LRT, GERP++, SiPhy, phyloP e phastCons. A pontuação REVEL para uma variante *missense* pode variar de 0 a 1, com pontuações mais altas refletindo maior probabilidade de que a variante cause um prejuízo na função da proteína (pontuações abaixo de 0,5 são consideradas como provavelmente benignas e acima de 0,5 são avaliadas como provavelmente associadas a doença). Dados adicionais sobre as variantes de interesse foram obtidos da Base de Dados de Gene e Variante Humana (Human Gene Mutation Database – HGMD - <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), OMIM (<https://www.omim.org>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), do banco de dados de variantes de Osteogenesis Imperfecta (OIVD - <https://www.le.ac.uk/ge/collagen/>) e do banco de dados de variantes no gene *ALPL* associado à HPP (<https://alplmutationdatabase.jku.at/>). A ausência de variantes no banco de dados de Osteogênese Imperfecta; de registros em artigos no PubMed e ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) em genes associados à OI foram o critério para classificar as variantes como novas.

### **3.3.3 Classificação de variantes de acordo com os critérios do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica**

As diretrizes do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG) definem um processo padronizado para classificação de variantes com base em critérios usando tipos típicos de evidência de variante e efeito na função da proteína (por exemplo, dados populacionais, computacionais, funcionais, segregação etc.) (RICHARDS *et al.*, 2015). O

ACMG classifica as variantes em cinco grupos: patogênica, provavelmente patogênica, provavelmente benigna, benigna e variante de significado incerto (VUS).

### 3.3.4 Análise de CNV – caso hipofosfatasia

Com o auxílio do *software* NextGENe, foi possível a investigação da variante de número de cópias (CNV) do caso de hipofosfatasia. Foi realizada uma modificação da extensão do arquivo BAM para .pit com o objetivo de realizar uma contagem relativa de fragmentos de DNA nas regiões de captura e a amostra foi analisada comparando com os demais casos presentes na mesma corrida. As regiões específicas de uma amostra e controle foram usadas para determinar uma taxa de cobertura (amostra dividida por amostra mais controle) em cada região. Para duplicação, espera-se três cópias na amostra e duas no controle (razão de 0,6) enquanto, para deleção espera-se uma cópia na amostra para duas cópias de controle (razão de 0,3).

## 3.4 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO DE PACIENTES COM OI

Para correlacionar o fenótipo clínico com as variantes genéticas foram usados: anotação de função gênica, padrão de herança genética da doença (OMIM: <https://omim.org>), informações de bancos de dados de doenças (*The Human Genome Database* - HGMD: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>; ClinVar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>; ClinGen: <https://clinicalgenome.org>) e pesquisa de literatura (PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). As comparações dos desfechos entre os genótipos foram feitas usando teste exato de Fisher, sendo que a diferença foi considerada estatisticamente significativa com  $P < 0.05$ .

## 3.5 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DE CASOS DE OI

Com o objetivo de realizar um levantamento dos tipos de OI e variantes reportadas em pacientes brasileiros, foi feita uma busca de artigos publicados de 2000 a fevereiro de 2023, em língua inglesa, espanhola ou em português disponíveis no PubMed e LILACS. Foram excluídos artigos de revisão, artigos sem variantes reportadas, paciente e/ou família de outras nacionalidades/países e aqueles indivíduos no qual o diagnóstico final foi de outra doença com diminuição da DMO. As palavras-chave utilizadas foram: osteogênese imperfeita no Brasil; osteogênese imperfeita em brasileiros.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

A casuística deste estudo foi composta por 32 indivíduos apresentando uma distribuição semelhante entre os sexos masculino e feminino (n=16), com idade que variou entre 1 dia de vida até 28 anos, com média de idade de 5 anos e 3 meses e mediana de 1 ano e 10 meses. Nove probandos (28,12%) eram filhos de casais consanguíneos e os genitores de um probando (F23.1) declararam não serem aparentados, embora sejam de uma mesma cidade pequena no interior da Bahia (Tucano), com 50.000 habitantes. Em relação ao diagnóstico clínico-radiológico, 27 dos indivíduos incluídos foi classificada como OI moderada/grave/letal (84,375%); dois com OPPG (6,25%); um paciente com STW (3,1%) e dois com hipofosfatasia (6,25%). Em relação a OI, os achados clínicos dos pacientes em geral mostraram que as anomalias ósseas estavam presentes em 27 indivíduos (100%), já com prejuízo no comprimento ao nascimento em 23 pacientes (85,19%). Para F17 e F23.2 não foi possível obter o registro do comprimento ao nascimento. Observou-se um agravo do déficit de crescimento na evolução em 22 (81,48%), com deformidades ósseas em todos os indivíduos (100%) e comprometimento na deambulação em 14 (43,75%). Importante ressaltar que alguns parâmetros não foram avaliados e/ou observados em alguns pacientes, devido ao óbito precoce e/ou pela idade quando foram atendidos, pois se trata de uma casuística com pacientes graves. Outros achados não esqueléticos observados nos indivíduos com OI foram a presença de escleras azuladas/acinzentadas em 13 (51,85%) e a DI em 6 pacientes (22,22%). Cinco indivíduos (F11.1, F11.5, F15, F19 e F21) tiveram suas fraturas estabilizadas com hastas intramedulares. A terapia frequentemente empregada nos casos moderados/graves incluiu o uso de bisfosfonatos em 19 casos (59,37%).

Nos indivíduos com outros diagnósticos clínicos que não a OI observou-se uma menor prevalência de fraturas ósseas, com achados cardinais presentes nas diferentes condições, como anomalias oculares graves nos pacientes com OPPG, sinais de disautonomia no paciente com STW e craniossinostose da sutura sagital em um caso de hipofosfatasia, além de anomalias ósseas que direcionavam a esses diagnósticos nas duas últimas condições. Os pacientes com fenótipo de OI tipo II (n=7) vieram a óbito no período neonatal e o probando F28, com diagnóstico da STW, na idade de 1 ano e 10 meses por pneumonia. Os achados clínicos estão detalhados no **quadro 6**. Os achados radiológicos dos indivíduos com OI tipos III e IV, associados às formas recessivas de OI, estão apresentadas na **Figura 3**; os dos indivíduos com OI tipo II na **Figura 4** e com OPPG, STW e hipofosfatasia na **Figura 5**.

**Quadro 6 -** Probandos e familiares, hipótese clínica e achados fenotípicos

Família/ Indivíduo (sexo)	Fenótipo	Achados intraútero	Comprimento nascimento (Idade gestacional) Z-score	Última estatura (idade)	Deformidades em membros	Número de fraturas	Deambulação	Cor da esclera e DI	Tratamento	Outros achados
<b>F1 (M)</b>	OI tipo II	Sim	38,5 cm (38sem) -4.59	38,5 cm (1d) -4.59	Sim, inferiores	>10	NA	- / NA	Não	Óbito (1 m)
<b>F2 (M)</b>	OI tipo III	Sim	36,5 cm (38sem) -5.44	76,5 cm (6a1m) -7.7	Sim, inferiores e superiores	24	Não	Azulada / Sim	Sim (7m)	
<b>F3 (M)</b>	OI tipo II	Sim	36 cm (38sem) -5.65	36 cm (17 d) -8.7	Sim, inferiores e superiores	>10	NA	Azulada / NA	Não	Óbito (33 d)
<b>F4.1 (M)</b>	OI tipo III	Sim	35 cm (37sem) -5.52	73,5 cm (3a9m) -6.6	Sim, inferiores	>10	Não	Branca / Não	Sim (1m)	Nefrocalcinose e acidose tubular renal tipo IV
<b>F4.2 (mãe de F4.1) (F)</b>	Sem sinais de OI	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>F4.3 (pai de F4.1) (M)</b>	Sem sinais de OI	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>F5 (F)</b>	OI tipo III/IV	Sim	42 cm (39sem) -3.59	50 cm (2m10d) -3.2	Sim, inferiores	4	NA	Branca / NA	Sim (1m)	
<b>F6 (M)</b>	OI tipo III	Sim	38 cm (39 sem 5/7) -5.71	51.5 (7m) -7.0	Sim, inferiores	5	NA	Acinzentada/ NA	Sim (1m)	Dificuldade de alimentação (gastrostomia)
<b>F7(F)</b>	OI tipo III/IV	Sim	41,5 cm (34sem) -1.28	76 cm (2a) -2.7	Sim, inferiores	9	Sim (com apoio)	Acinzentada / Sim	Sim	
<b>F8 (F)</b>	OI tipo II	Sim	39 cm (40sem) -5.42	39cm (8d) -6.45	Sim, inferiores e superiores	>10	NA	Azulada / NA	Não	Óbito (8 d)
<b>F9 (M)</b>	OI tipo III	Sim	43 cm (38sem3/7) -2.88	72 cm (3a5m) -6.7	Sim, inferiores e superiores	16	Não	Branca / Sim	Sim (1a3m)	
<b>F10 (F)</b>	OI tipo III	Sim	38,5 cm (39 sem) -5.11	62 cm (1a9m) -6.2	Sim, inferiores e superiores	6	Não	Acinzentada / Sim	Sim (1m)	
<b>F11.1 (F)</b>	OI tipo III/IV	Sim	42 cm (34 sem) -0.75	122 cm (14a3m) -5.8	Sim, inferiores	>60	Não	Acinzentada / Sim	Sim (2m)	
<b>F11.2 (mãe de F11.1) (F)</b>	OI tipo I	Não	-	143.7 cm (40a) -3.01	Não	1	Sim	Azulada / Não	Não	
<b>F11.3 (pai de F11.1) (M)</b>	OI tipo I	Não	-	150 cm (52a) -3.7	Não	2	Sim	Branca / Não	Não	
<b>F11.4 (irmã de F11.1) (M)</b>	OI tipo I	Não	-	150.5 cm (18a2m) -1.91	Não	Não	Sim	Azulada / Não	Sim (13a6m)	
<b>F11.5 (primo de F11.1) (M)</b>	OI tipo IV	Não	49 cm (37sem) +0.31	149.5 cm (18a9m) -3.6	Sim, inferiores (leve)	13	Sim	Branca / Não	Sim (7a7m)	
<b>F11.6 (prima de F11.1) (F)</b>	OI tipo IV	Não	47 cm (36sem) +0.21	146.5 cm (16a3m) -2.4	Sim, inferiores (leve)	1	Sim	Acinzentada / Sim	Sim (6a)	
<b>F11.7 (tia materna de F11.1) (F)</b>	OI tipo I	Não	-	152 cm (45a) -1.73	Não	0	Sim	Branca / Não	Não	

Família/ Indivíduo (sexo)	Fenótipo	Achados intraútero	Comprimento nascimento (Idade gestacional) Z-score	Última estatura (idade)	Deformidades em membros	Número de fraturas	Deambulação	Cor da esclera e DI	Tratamento	Outros achados
<b>F12 (M)</b>	OI tipo III	Sim	41,5cm (39sem) -3.81	69 cm (2a3m) -5.3	Sim, inferiores e superiores	15	Não	Acinzentada / Não	Sim (8d)	
<b>F13 (M)</b>	OI tipo II	Sim	40 cm (39sem) -4.46	-	Sim, inferiores e superiores	>10	NA	- / NA	Não	Óbito (1m23d)
<b>F14 (F)</b>	OI tipo III	Sim	45 cm (38sem) -1.48	50 cm (11m) -7.8	Sim, inferiores e superiores	16	NA	Branca / Não	Sim (2m)	
<b>F15 (F)</b>	OI tipo III	Sim	38 cm (34sem) -2.26	63 (4a4m) -8.9	Sim, inferiores e superiores	>10	Não	Azulada / Sim	Sim (1m)	Hidrocefalia
<b>F16 (F)</b>	OI tipo II	Sim	33,5 cm (33sem) -3.44	-	Sim, inferiores e superiores	>10	NA	- / NA	Não	Óbito (10d)
<b>F17 (M)</b>	OI tipo II	Sim	Não registrado (39sem)	-	Sim, inferiores e superiores	NA	NA	- / NA	Não	Natimorto
<b>F18 (F)</b>	OI tipo III	Sim	44 cm (37sem) -1.43	51 cm (11m) -7.5	Sim, inferiores e superiores	4	NA	Acinzentada / NA	Sim (1m)	Dificuldade de alimentação (sonda nasogástrica)
<b>F19 (F)</b>	OI tipo III	Sim	34 cm (37sem) -5.43	120 cm (15a3m) -6.5	Sim, inferiores e superiores	42	Não	Branca / Não	Sim (5m)	
<b>F20 (M)</b>	OI tipo III/IV	Sim	43 cm (36sem) -1.71	55 (7m) -4.4	Sim, inferiores	4	NA	Branca / NA	Sim (2m)	
<b>F21 (M)</b>	OI tipo III/IV	Não	46 cm (35sem) 0	121 cm (13a10m) -5.2	Sim, inferiores e superiores	20	Não	Azulada / Não	Sim (2a)	
<b>F22 (F)</b>	OI tipo II/III	Sim	38.5 cm (38sem) -4.16	59 cm (4a2m) -9.9	Sim, inferiores e superiores	7	Não	Branca / Não	Sim (3m)	Traqueostomia/ Gastrostomia/ Epilepsia
<b>F23.1 (F)</b>	OI tipo III	Não	48 cm (termo) -1.41	118 cm (22a1m) -7.0	Sim, inferiores e superiores	>50	Não	Branca / Não	Sim (6a)	
<b>F23.2 (meia irmã de F23.1) (F)</b>	OI tipo III/IV	Sim	- (termo)	136.5 cm (16a3m) -3.97	Sim, inferiores e superiores	>30	Não	Branca / Não	Sim (7a)	
<b>F24 (M)</b>	OI tipo III	Não	52 cm (termo) +0.04	142 cm (15a) -3.4	Sim, inferiores e superiores	>20	Não	Branca / Não	Sim (5a – irregular)	Oligodontia
<b>F25 (M)</b>	OI tipo III	Sim	46 cm (38sem) -1.40	100 cm (10a8m) -6.2	Sim, inferiores	>20	Não	Branca / Não	Sim (1a)	Várias pseudoartroses; anormalidades na junção craniocervical
<b>F26.1 (M)</b>	OI tipo II	Sim	37cm (pré-termo 35sem1/7) -4.77	-	Sim, inferiores e superiores	>10	NA	- / NA	Não	Óbito em 15 minutos
<b>F26.2 (mãe de F26.1) (F)</b>	Sem sinais de OI	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>F26.3 (pai de F26.1) (M)</b>	Sem sinais de OI	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>F27 (F)</b>	OI tipo II	Sim	40 cm (31sem) -0.55	-	Sim, inferiores e superiores	>10	NA	- / NA	Não	Paquigiria e agenesia de corpo caloso Óbito (19d)

Família/ Indivíduo (sexo)	Fenótipo	Achados intraútero	Comprimento nascimento (Idade gestacional) Z-score	Última estatura (idade)	Deformidades em membros	Número de fraturas	Deambulação	Cor da esclera e DI	Tratamento	Outros achados
F28(M)	STW	Sim	43 cm (35sem3/7) -2.02	69 cm (1a3m) -3.3	Sim, inferiores	0	NA	Branca / Não	Não	Hipertermia sem causa infecciosa Óbito (1a 10m - pneumonia)
F29 (M)	OPPG	Não	51 cm (termo) -0.65	103 cm (7a7m) -4.0	Sim	10	Sim	Branca / Não	Sim	Anomalia ocular diagnosticada com 3 meses: descolamento da retina e catarata - amaurose
F30.1 (F)	OPPG	Não	Termo (-)	140cm (28a) -3.6	Não	>20	Não	Branca / Não	Não*	Diagnóstico com 1a 2m de problema ocular: phthisis bulbi - cegueira
F31 (F)	Hipofosfatasia da lactância	Não	48 cm (termo) -1.96	94 cm (4a) -1.97	Não	0	Sim	Branca/ Não	Não**	Perdas dentárias com raiz
F32 (F)	Hipofosfatasia perinatal benigna	Sim	47 cm (termo) -2.39	113.5 cm (7a 4m) -1.86	Sim, inferiores e superiores	0	Sim	Branca/ Não	Não	Perdas dentárias com raiz

Legenda: - informação não disponível; NA: não se aplica; BP: bisfosfonatos; \*calcitonina; \*\*asfotase alfa; DI: dentinogênese imperfeita; OI: osteogênese imperfeita; OPPG: osteoporose pseudoglioma; STW: síndrome de Stüve-Wiedemann

## 4.2. DADOS MOLECULARES

Nos 32 probandos avaliados, variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em genes associados a doenças monogênicas com diminuição da DMO foram identificadas em 90,62% (n=29) deles, sendo 24 casos de OI e 5 casos com os diagnósticos da STW, OPPG e hipofosfatase.

Em três indivíduos com diagnóstico clínico de OI, os estudos foram negativos ou inconclusivos. Em F4, a variante intrônica identificada em *COL1A1* foi classificada como VUS. Seus genitores realizaram também sequenciamento do exoma e não foram detectadas variantes em outros genes que pudessem explicar o quadro clínico-radiológico de OI. Pela indisponibilidade do material genético de F26.1, com hipótese diagnóstica de OI tipo II e óbito com 15 minutos de vida, os pais desta criança, consanguíneos e sem sinais clínicos de OI, foram incluídos neste estudo. O sequenciamento do exoma de ambos não evidenciou nenhuma variante patogênica/provavelmente patogênica em genes reconhecidamente associados a doenças ósseas com baixa DMO, incluindo aqui os genes responsáveis pelas formas recessivas de OI e os genes da via Wnt/RANKL selecionados. Para o probando F27, com hipótese clínica de OI tipo II, a análise molecular foi realizada por um painel customizado (painel 3), com resultado negativo. Não foi possível prosseguir na investigação pela indisponibilidade da família.

Em relação a casuística de 27 pacientes com OI, dos 24 com variantes classificadas como patogênica/provavelmente patogênica, 62,96% apresentaram variantes em *COL1A1/2* (n=17) (**Figuras 1 e 2**), sendo que em uma paciente (F11.1), com fenótipo mais grave de OI e filha de pais consanguíneos e diversos casos leves de OI, foi observada a presença da variante c.2314G>A:p.(Gly772Ser) em homozigose em *COL1A2* (**Quadro 7**).

Já 29,2% (n=7) dos probandos apresentaram variantes bialélicas em homozigose/heterozigose composta em genes relacionados a formas de OI com um padrão de herança AR (*CCDC134; CRTAP; FKBP10, MESD; SERPINF1 e P3H1*). Dentre os seis indivíduos com variantes em homozigose, consanguinidade foi declarada em quatro famílias (F19; F22; F24 e F25) e, em uma delas (F23.1 e F23.2), os genitores eram provenientes da mesma cidade do interior do estado da Bahia (Tucano). No probando 21, com variante em homozigose em *FKBP10*, 11 outras variantes raras em homozigose, espalhadas pelo genoma dentre 820 no total, foram observadas, sendo que a cobertura da região do gene era semelhante à de outros indivíduos da mesma corrida. O indivíduo com variante em *MESD* foi incluído em um estudo colaborativo e reportado em 2019 (MOOSA *et al.*, 2019).

Variantes do tipo deleção foram identificadas em F28 com diagnóstico de STW (deleção em homozigose englobando os éxons 15-20 em *LIFR*) e F31 com diagnóstico de hipofosfatase forma perinatal benigna (deleção em heterozigose do gene *ALPL*), conforme demonstrado nas **Figuras 7 e 8**, respectivamente. As variantes identificadas nos diferentes genes na nossa casuística, com suas frequências em controles, análise *in silico* de dano à proteína, presença em bancos de dados de doenças específicas/ClinVar ou reportadas na literatura, assim como a classificação baseada nos critérios ACMG encontram-se no **Quadro 7**.

**Quadro 7 - Análise molecular dos probandos com fenótipo de OI e outras doenças monogênicas com DMO diminuída e familiares avaliados**

Probando ou familiar (fenótipo)	Consanguinidade/recorrência	Variante e zigosidade	Tipo de variante	Frequência gnomAD / AbraOM	Preditor in silico	ClinVar / Referência	Classificação de acordo com ACMG	LOV D/OI VD	Reportada PubMed	População
<b>COL1A1 (NM_000088)</b>										
F1 (OI tipo II)	-/-	c.1363G>A : p.(Gly455Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.934 (REVEL)	Provavelmente patogênica RCV000507289.1	Provavelmente patogênica (PM2, PS4_sup, PP3, PM5, PP4)	-	-	
F2 (OI tipo II)	-/-	c.2596G>A : p.(Gly866Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.979 (REVEL)	Patogênica RCV001213033	Provavelmente patogênica (PM2, PS4, PM1, PP3, PP4)	-	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2021 ; KAWAKITA <i>et al.</i> , 2018; YIN <i>et al.</i> , 2018; HO DUY <i>et al.</i> , 2016 ; LUND <i>et al.</i> , 1999 ; LINDAHL <i>et al.</i> , 2015	Japonesa; Americana; Chinesa; Vietnamita; Dinamarquesa; Sueca
F3 (OI tipo II)	-/-	c.2235+1G>A Heterozigose	Splicing	-/-	0.94 (SpliceAI)	Patogênica RCV000490759	Provavelmente patogênica (PVS1_mod, PM2, PS4_sup, PP3, PP4)	-	ANDERSSON <i>et al.</i> , 2017 ; STUBBE <i>et al.</i> , 2017 ; LINDAHL <i>et al.</i> , 2015	Sueca; Croata; Sueca
<b>F4.1 (OI tipo III)</b>	-/-	<b>c.2938-70G&gt;A Heterozigose</b>	<b>Splicing</b>	-/-	<b>0.02 (SpliceAI)</b>	-	<b>VUS (PM2, PM6, PP4)</b>	-	<b>No presente estudo</b>	
F4.2 (mãe de F4.1 – sem sinais clínicos de OI)	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F4.3 (pai de F4.1 – sem sinais clínicos de OI)	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F5 (OI tipo IV)	-/-	c.2200G>A : p.(Gly734Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.997 (REVEL)	Patogênica RCV001913480	Provavelmente patogênica (PM2 + PS4_sup + PM1 + PM5)	-	-	
F6 (OI tipo III)	-/-	c.2155G>A : p.(Gly719Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.993 (REVEL)	Patogênica RCV000490715.1	Patogênica (PM2, PS4, PM1, PP4)		LINDAHL <i>et al.</i> , 2015	Sueca
<b>COL1A2 (NM_000089)</b>										
F7 (OI tipo III/IV)	-/-	c.982G>A : p.(Gly328Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.987 (REVEL)	Patogênica VCV000456848.9	Patogênica (PM2, PS4, PP3, PM1, PP4)	Sim	CHOI <i>et al.</i> , 2022 ; ZHYTNIK <i>et al.</i> , 2019 ; HO DUY <i>et al.</i> , 2016 ; WANG <i>et al.</i> , 2015 ; LEE <i>et al.</i> , 2006 ; HOLTZ <i>et al.</i> , 2023	Coreana; Ucrainiana; Vietnamita; Chinesa; Indiana; Brasileira
F8 (OI tipo II)	-/+ (meia irmã por parte da mãe falecida)	<b>c.1064G&gt;A : p.(Gly355Glu) Heterozigose</b>	<b>Missense</b>	-/-	<b>0.994 (REVEL)</b>	-	<b>Provavelmente patogênica (PM2, PM1, PP3, PP4)</b>	<b>Sim</b>	<b>No presente estudo</b>	
F9 (OI tipo III)	-/-	c.1072G>A : p.(Gly358Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.981 (REVEL)	Patogênica RCV000553394.2	Patogênica (PM2, PS4, PM1, PP4)	Sim	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2021 ; LI Y <i>et al.</i> , 2019 ; HO DUY <i>et al.</i> , 2016 ; LEE <i>et al.</i> , 2006 ; HOLTZ <i>et al.</i> , 2023	Japonesa; Chinesa; Vietnamita; Coreana; Brasileira
<b>F10 (OI tipo III)</b>	-/-	<b>c.2108_2109insTCCTGCTGC :p.(Ala705_Gly706insAlaProAla) Heterozigose</b>	<b>In frame</b>	-/-	-	-	<b>Provavelmente patogênica (PM2, PM4, PM1, PP4)</b>	-	<b>No presente estudo</b>	

COLIA2 (NM_000089)										
F11.1 (OI tipo III)	+/+	c.2314G>A : p.(Gly772Ser) Homozigose	Missense	-/-	0.919 (REVEL)	Patogênica RCV000552877	Patogênica (PM2, PS4_mod, PM1, PP3, PP4)	Sim	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2021 ; TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 ; FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 ; ZHYTNIK <i>et al.</i> , 2019 ; LU Y <i>et al.</i> , 2013	Japonesa; Brasileira; Ucraniana; Chinesa
F11.2 (mãe de F11.1 - OI tipo I)	-/-	c.2314G>A : p.(Gly772Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.919 (REVEL)	Patogênica RCV000552877	Patogênica (PM2, PS4_mod, PM1, PP3, PP4)	Sim	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2021 ; TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 ; FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 ; ZHYTNIK <i>et al.</i> , 2019 ; LU Y <i>et al.</i> , 2013	Japonesa; Brasileira; Ucraniana; Chinesa
F11.3 (pai de F11.1 - OI tipo I)	-/-	c.2314G>A : p.(Gly772Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.919 (REVEL)	Patogênica RCV000552877	Patogênica (PM2, PS4_mod, PM1, PP3, PP4)	Sim	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2021 ; TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 ; FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 ; ZHYTNIK <i>et al.</i> , 2019 ; LU Y <i>et al.</i> , 2013	Japonesa; Brasileira; Ucraniana; Chinesa
F11.4 (irmã de F11.1 - OI tipo I)	+/+	c.2314G>A : p.(Gly772Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.919 (REVEL)	Patogênica RCV000552877	Patogênica (PM2, PS4_mod, PM1, PP3, PP4)	Sim	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2021 ; TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 ; FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 ; ZHYTNIK <i>et al.</i> , 2019 ; LU Y <i>et al.</i> , 2013	Japonesa; Brasileira; Ucraniana; Chinesa
F11.5 (primo de F11.1 - OI tipo IV)	-/+	c.2314G>A : p.(Gly772Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.919 (REVEL)	Patogênica RCV000552877	Patogênica (PM2, PS4_mod, PM1, PP3, PP4)	Sim	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2021 ; TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 ; FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 ; ZHYTNIK <i>et al.</i> , 2019 ; LU Y <i>et al.</i> , 2013	Japonesa; Brasileira; Ucraniana; Chinesa
F11.6 (prima de F11.1 - OI tipo IV)	-/+	c.2314G>A : p.(Gly772Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.919 (REVEL)	Patogênica RCV000552877	Patogênica (PM2, PS4_mod, PM1, PP3, PP4)	Sim	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2021 ; TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 ; FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 ; ZHYTNIK <i>et al.</i> , 2019 ; LU Y <i>et al.</i> , 2013	Japonesa; Brasileira; Ucraniana; Chinesa
F11.7 (tia materna de F11.1 - OI tipo I)	-/-	c.2314G>A : p.(Gly772Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.919 (REVEL)	Patogênica RCV000552877	Patogênica (PM2, PS4_mod, PM1, PP3, PP4)	Sim	HIGUCHI <i>et al.</i> , 2021 ; TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 ; FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 ; ZHYTNIK <i>et al.</i> , 2019 ; LU Y <i>et al.</i> , 2013	Japonesa; Brasileira; Ucraniana; Chinesa
F12 (OI tipo III)	-/-	c.2845G>A : p.(Gly949Ser) Heterozigose	Missense	-/-	0.982 (REVEL)	Patogênica VCV000618026.5	Provavelmente patogênica (PM2, PS4_sup, PM1, PP3, PP4)	Sim	CHANDLER <i>et al.</i> , 2022 ; SALACINSKA <i>et al.</i> , 2021 ; HOU R. <i>et al.</i> , 2020 ; BODIAN <i>et al.</i> , 2009	Inglesa; Polonesa; Chinesa; Americana
F13 (OI tipo II)	-/-	c.3142G>T : p.(Gly1048Cys) Heterozigose	Missense	-/-	0.992 (REVEL)	-	Provavelmente patogênica (PM2, PM1, PP3, PP4)	Sim	DONG <i>et al.</i> , 2016	Chinesa
F14 (OI tipo III)	-/+ (meia irmã por parte de pai falecida)	c.3278G>A : p.(Gly1093Asp) Heterozigose	Missense	-/-	0.937 (REVEL)	-	Provavelmente patogênica (PM2, PM1, PP3, PP4)	Sim	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019	Brasileira
F15 (OI tipo III)	-/-	c.3286G>C / p.(Gly1096Arg) Heterozigose	Missense	-/-	0.925 (REVEL)	Patogênica RCV001202983.1	Provavelmente patogênica (PM2, PM1, PM5, PP4)	-		
F16 (OI tipo II)	-/-	c.1971+3A>T Heterozigose	Splicing	-/-	0.01 (SpliceAI)	VUS VCV000643052.3	Provavelmente patogênica (PP3_str, PM2, PP4)	-		
F17 (OI tipo II)	-/-	c.2720G>A : p.(Gly907Asp) Heterozigose	Missense	-/-	0.992 (REVEL)	Patogênica VCV000017239.2	Provavelmente patogênica (PM2, PS4_sup, PM5, PM1, PP4)	-	BALDWIN <i>et al.</i> , 1989	Americana



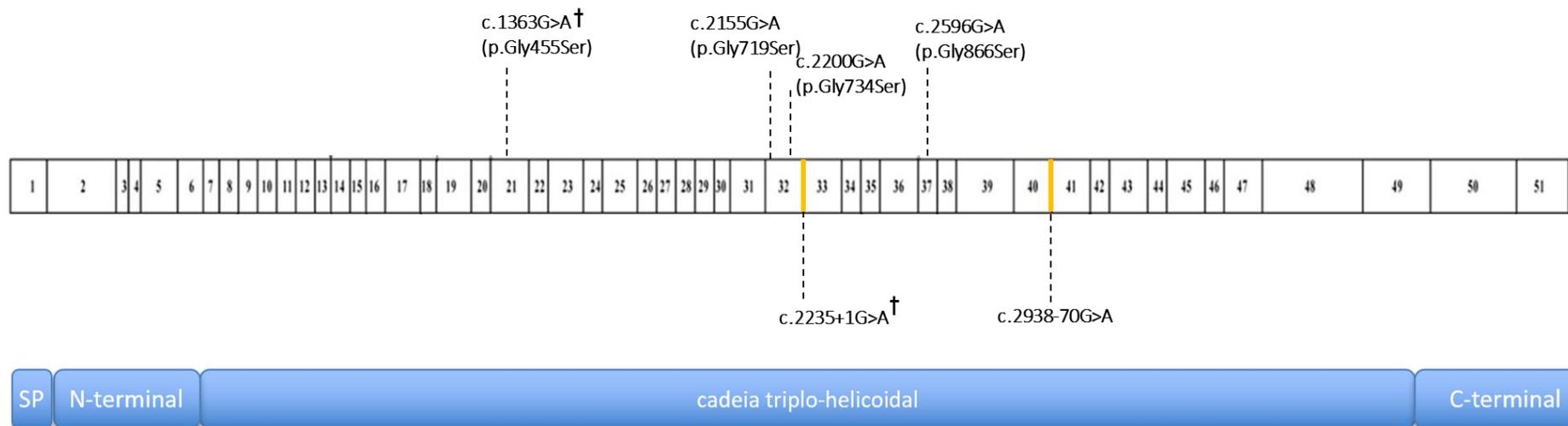
F26.3 (pai de F261.- sem sinais clínicos de OI)	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F27 (OI tipo II)	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LIFR (NM_001127671.2)</b>										
F28 (STW)	+/-	Deleção éxons 15-20 Homozigose	Deleção intragênica	-/-	-	-	Patogênica (PVS1, PM2)	-	HATAGAMI MARQUES <i>et al.</i> , 2015	Brasileira
<b>LRP5 (NM_002335)</b>										
F29 (OPPG)	-/-	<b>c.1165T&gt;C : p.Trp389Arg Heterozigose</b>	<i>Missense</i>	-/-	<b>0.952 (REVEL)</b>	-	<b>Provavelmente patogênica (PM2, PP3, PM1, PP4)</b>	-	<b>No presente estudo</b>	
	-/-	c.3122C>T : p.Thr1041Met Heterozigose	<i>Missense</i>	0.00000795 /-	0.903 (REVEL)	VUS VCV001450334.1	Provavelmente patogênica (PM2, PP3, PS4_mod, PP4)	-	LI JK <i>et al.</i> , 2018	Chinesa
F30.1 (OPPG)	+/-	c.3122C>T : p.Thr1041Met Homozigose	<i>Missense</i>	0.00000795 /-	0.903 (REVEL)	VUS VCV001450334.1	Provavelmente patogênica (PM2, PP3, PS4_sup, PP4)	-	LI JK <i>et al.</i> , 2018	Chinesa
F30.2 (mãe de F30.1 – sem sinais clínicos de OPPG)	-/-	c.3122C>T : p.Thr1041Met Heterozigose	<i>Missense</i>	0.00000795 /-	0.903 (REVEL)	VUS VCV001450334.1	Provavelmente patogênica (PM2, PP3, PS4_mod, PP4)	-	LI JK <i>et al.</i> , 2018	Chinesa
F30.3 (pai de F30.1 – sem sinais clínicos de OPPG)	-/-	c.3122C>T : p.Thr1041Met Heterozigose	<i>Missense</i>	0.00000795 /-	0.903 (REVEL)	VUS VCV001450334.1	Provavelmente patogênica (PM2, PP3, PS4_mod, PP4)	-	LI JK <i>et al.</i> , 2018	Chinesa
<b>ALPL (NM_000478.4)</b>										
F31 (Hipofosfatasia forma da lactância)	-/-	c.98C>T : p.Ala33Val Heterozigose	<i>Missense</i>	0.0000119 /-	0.874 (REVEL)	Conflitante - Patogênica e VUS VCV000013667.5	Provavelmente patogênica (PM2, PP3, PM3, PP4)	Sim	ZHANG <i>et al.</i> , 2022 ; REIS <i>et al.</i> , 2020 ; HENTHORN <i>et al.</i> , 1992	Chinesa; Brasileira; Americana
	-/-	<b>c.139A&gt;C : p.Asn47His Heterozigose</b>	<i>Missense</i>	-/-	<b>0.574 (REVEL)</b>	-	<b>Provavelmente patogênica (PM2, PP3, PM5, PP4)</b>	-	<b>No presente estudo</b>	
F32 (Hipofosfatasia perinatal benigna)	-/-	c.542C>T : p.Ser181Leu Heterozigose	<i>Missense</i>	0.0000398 /-	0.794 (REVEL)	Patogênica/provavelme nte patogênica VCV000188798.11	Patogênica (PS3_sup, PS4_mod, PM2, PM3, PP3_sup)	Sim	ARACI <i>et al.</i> , 2021 ; JANDL <i>et al.</i> , 2021 ; CASALINI <i>et al.</i> , 2020	Turca; Alemã; Italiana
	-/-	<b>Deleção completa do gene Heterozigose</b>	<b>Deleção</b>	-/-		-	<b>Patogênica (PVS1, PM2)</b>	-	<b>No presente estudo</b>	

- = ausente; Freq. = frequência; VUS = variante de significado incerto

**COL1A1 (NM\_000088)**

† = Casos letais

| = Região intrônica



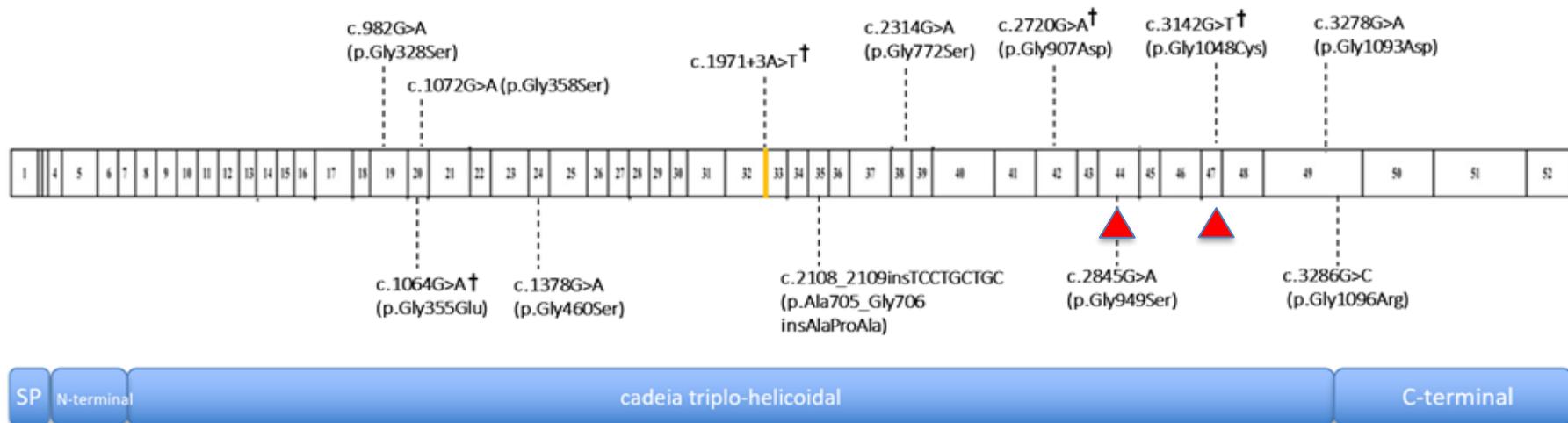
**Figura 1 - Distribuição de variantes detectadas neste estudo em COL1A1 nos probandos com OI moderada/grave/letal.**

Os éxons do gene estão numerados e representados no retângulo em branco enquanto a proteína está representada em azul. Quatro variantes detectadas promovem uma substituição da glicina por outro aminoácido e outras duas afetam possivelmente o sítio de *splicing*. Os dois clusters associados a casos letais são mudanças na glicina que ocorrem nas posições (I) 869-1001 e (II) 1088-1142. Nota-se que nenhuma substituição está localizada nestas regiões (MARINI *et al.*, 2007).

## COL1A2 (NM\_000089)

† = Casos letais

| = Região intrônica



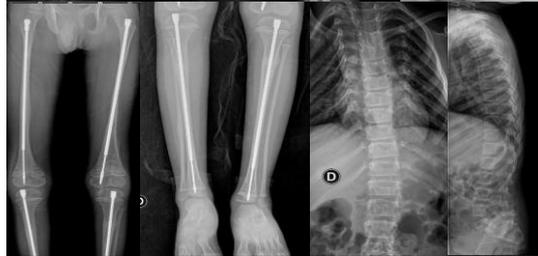
**Figura 2 -Distribuição de variantes detectadas neste estudo em COL1A2 nos probandos com OI moderada/grave/letal.**

Os éxons do gene estão numerados e representados no retângulo em branco, enquanto a proteína está representada em azul. Nota-se que maioria das variantes detectadas promovem uma substituição da glicina por outro aminoácido. Uma variante afeta possivelmente o sítio de *splicing* e outra é uma variante do tipo inserção *inframe*. Os oito clusteres associados a casos letais são mudanças na glicina que ocorrem nas posições (I) 409-454; (II) 541-592; (III) 637-670; (IV) 712-727; (V) 784-796; (VI) 847-901; (VII) 949-997 e (VIII) 1027-1084. Nota-se as substituições nestas regiões estão sinalizadas com um triângulo vermelho (MARINI *et al.*, 2007).

**SERPINF1**  
F23.1 – 20 anos



**FKBP10**  
F21 – 7 anos



**P3H1**  
F22 – 1 ano e 8 meses



**CRTAP**  
F19 – 11 anos



**MESD**  
F24 – 12 anos



**CCDC134**  
F25 - 3 e 7 anos



**Figura 3 - Imagens radiológicas dos pacientes com as formas recessivas de OI.** Observa-se nestes pacientes ossos longos com deformidades acentuadas, presença de hastes intramedulares, fraturas de compressão vertebral, pseudoartroses.

**COL1A1**

F1



**COL1A1**

F3



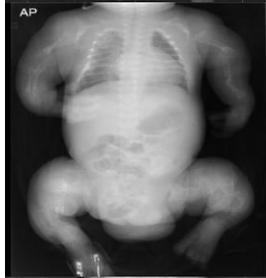
**COL1A2**

F8



**COL1A2**

F13



**COL1A2**

F16

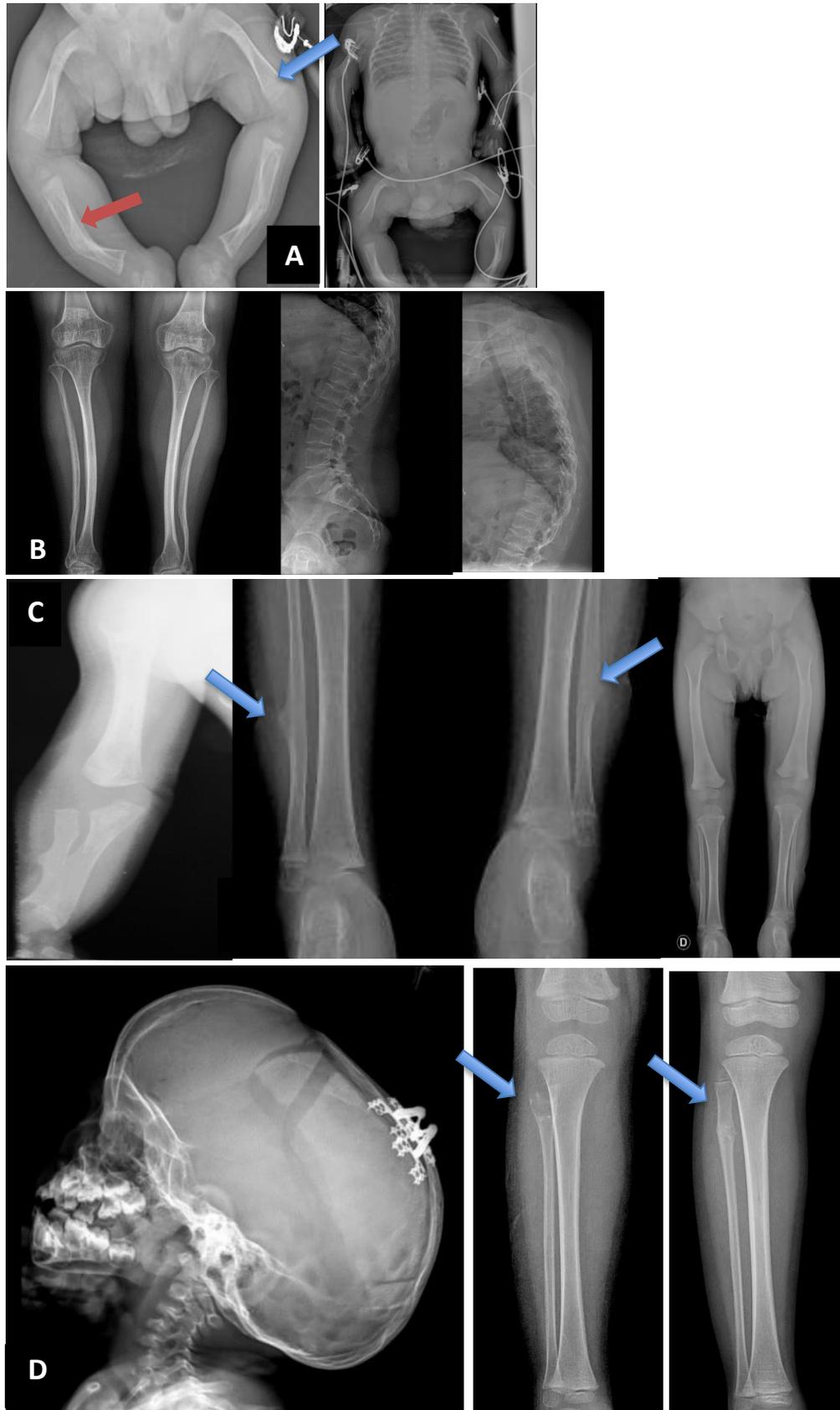


**Sem molecular**

F26.1

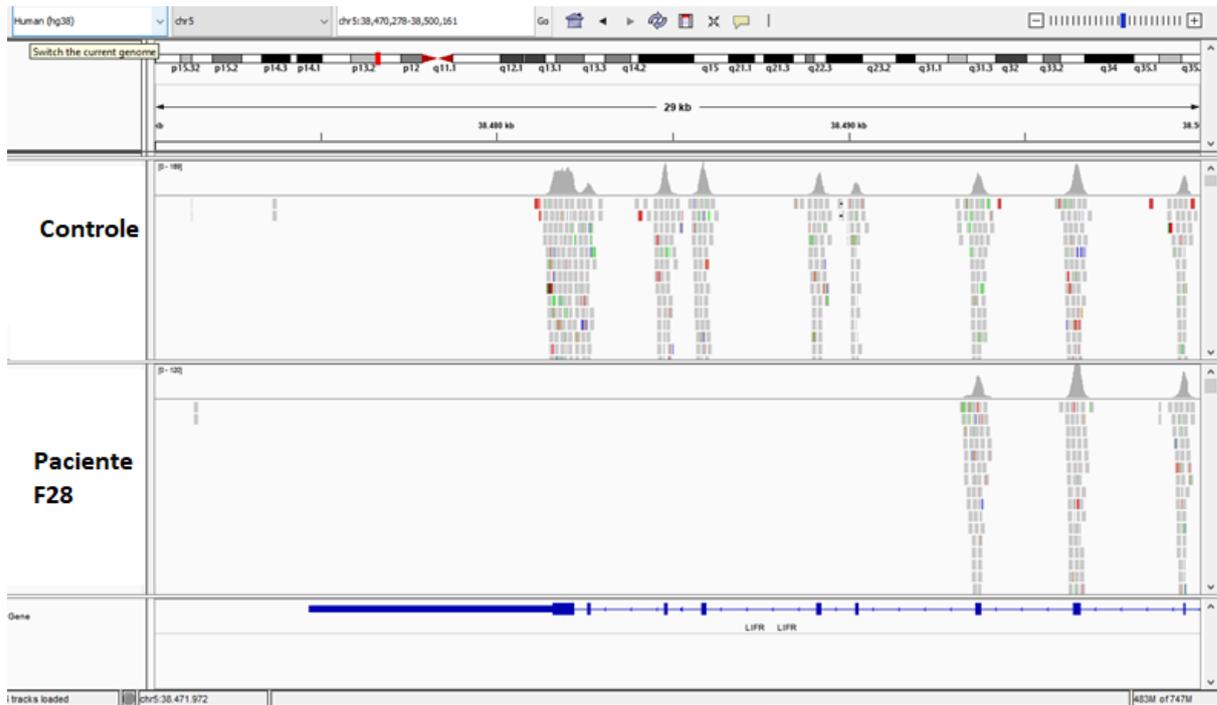


**Figura 4 - Babygrama de pacientes com OI tipo II.** Nestes pacientes é possível observar densidade óssea diminuída, ossos longos bem encurtados e alargados, com encurvamento e presença de fraturas ósseas.

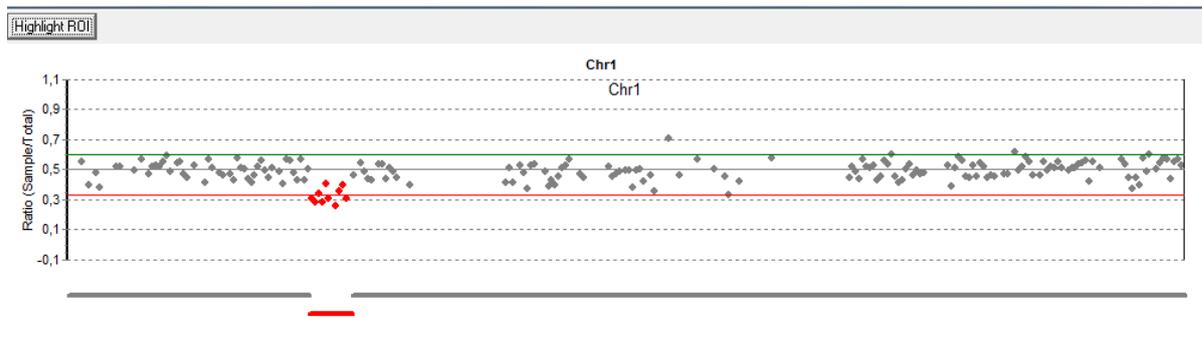


**Figura 5 - Imagens do raio-X dos probandos com outras doenças ósseas com baixa DMO**

A) Paciente F28/STW (lactente) com encurvamento dos ossos longos, alargamento metafisário (seta azul) e reforço cortical na concavidade do osso longo (seta vermelha); B) F30.1/OPPG (idade adulta) com baixa DMO, ossos longos encurvados e vértebras biconvexas, com cifose dorsal; C) F32/hipofosfatase forma pré-natal benigna (Idade) mostrando encurvamento dos ossos longos, baixa DMO e tubérculos de Bowdler (setas azuis); D) F31/hipofosfatase forma infantil (2 anos e 4 anos) mostrando crânio dolicocefálico, pós cirurgia da craniossinostose da sutura sagital, calcificação deficitária na região proximal da fíbula e posterior calcificação da região pós tratamento medicamentoso (setas azuis).



**Figura 6 - Deleção em homozigose nos éxons 15-20 do gene *LIFR* detectada na amostra do paciente F28 com fenótipo de STW.** A captura foi realizada com sondas de homologia para todas as regiões de éxon de *LIFR* por NGS. Observe que todos os éxons estão representados no controle, enquanto em nosso paciente os éxons 15-20 estão completamente ausentes. Isto indica uma deleção em homozigose desses éxons. Imagem obtida pelo software *Integrative Genomics Viewer* (IGV).



**Figura 7 - Deleção do gene *ALPL* identificada na amostra da paciente F32 com quadro de hipofosfatasia detectada pelo software CNVKit.** O intervalo com a deleção envolve pelo menos as posições genômicas 21880472-21903877 (hg19), o que corresponde aos éxons 2-11 do gene *ALPL*.

#### 4.2 CORRELAÇÃO FENÓTIPO-GENÓTIPO DE PACIENTES OI

Na tentativa de estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo, foram comparados os indivíduos com OI apresentando alterações na síntese do colágeno I (genes *COL1A1* e *COL1A2*) com aqueles com modificação pós-traducional do colágeno (genes *CRTAP* e *P3H1*), no processamento ou *cross-linking* (*FKBP10*) e na mineralização óssea (*SERPINF1*). Esta correlação foi baseada na classificação dos defeitos genéticos envolvidos em vias metabólicas intracelulares ou extracelulares alteradas, de acordo com classificação proposta por Forlino & Marini (FORLINO & MARINI, 2016) (**Quadro 8**). Acrescentamos ao grupo D, *CCDC134* pois foi observado por Dubail e colegas que a mineralização óssea é prejudicada em pacientes portadores de variantes no gene (DUBAIL *et al.*, 2020), assim como o gene *MESD*, que atua na via de sinalização WNT.

**Quadro 8** - Correlação de achados fenotípicos e genes envolvidos na casuística de pacientes com OI

	Síntese e estrutura do colágeno tipo I - F1 a F18	Modificação pós-traducional do colágeno tipo I / processamento e crosslinking/ mineralização óssea - F19 a F25	Teste exato de Fisher
<b>Achados intraútero</b>	18/18	4/7	0.0700
<b>Letalidade</b>	6/18	0/7	0.1372
<b>Deformidades em ambos os membros</b>	12/18	5/7	1.000
<b>Deformidade membros inferiores</b>	6/18	2/7	1.000
<b>Deambulação</b>	1/7	0/6	1.000
<b>Cor da esclera azulada ou acinzentada</b>	12/15	1/7	0.0066*
<b>Dentinogênese imperfeita</b>	6/9	0/6	0.0278*

\*P<0.05

#### 4.3 LEVANTAMENTO DE CASOS DE OI COM AVALIAÇÃO MOLECULAR EM PACIENTES BRASILEIROS PUBLICADOS

A pesquisa encontrou 84 artigos científicos, tendo sido selecionados aqueles com informação clínica do paciente e com realização de algum estudo molecular. Neste

levantamento, foram contemplados 213 pacientes brasileiros com OI e realização de estudo molecular disponíveis nos estudos selecionados (PALLOS *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2005; BARBIRATO *et al.*, 2009; ADUR *et al.*, 2013; KANETO *et al.*, 2014; MINILLO *et al.*, 2014; BRIZOLA *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2020; TRANCOZO *et al.*, 2019; BARBIRATO *et al.*, 2015; BARBIRATO *et al.*, 2016; MOOSA *et al.*, 2019; DE SOUZA *et al.*, 2021; AMORIM *et al.*, 2022; NAPOLEÃO *et al.*, 2022; HOLTZ *et al.*, 2023), com destaque para os seguintes pontos:

- 60 pacientes apresentavam OI leve; 1 caso letal (tipo II); 83 indivíduos com OI grave; 63 com fenótipo moderado; 1 considerado moderado/grave e 10 casos sem especificar o fenótipo de OI de acordo com a classificação de Sillence (SILLENCE *et al.*, 1979).

- Dos pacientes com OI leve (n=60), todos apresentavam variantes em *COL1A1* /2, sendo 45 com variantes em *COL1A1* (75%) e 15 em *COL1A2* (25%). A maioria das variantes eram do tipo *missense* e *splicing*.

- O único caso de OI letal com estudo molecular disponível reportado por HOLTZ e colegas (2023), demonstrou a presença de uma variante em *COL1A2*.

- Em relação ao fenótipo moderado (n=62), foram identificadas variantes principalmente nos genes *COL1A1* (n=28) e *COL1A2* (n=27) e, mais raramente, em *IFITM5* (n=2); *FKBP10* (n=3); *PLOD2* (n=1) e *TEM28B* (n=2).

- Dos 78 pacientes com OI grave, um destes casos foi reportado previamente por nosso grupo (MOOSA *et al.*, 2019). Neste grupo de OI tipo III, tivemos uma heterogeneidade maior de genes descritos: *COL1A1* (n=34); *COL1A2* (n=20); *IFITM5* (n=2); *P3H1* (n=5); *PLOD2* (n=1); *MESD* (n=3); *SERPINF1* (n=3); *FKBP10* (n=6); *CRTAP* (n=1); *PPIB* (n=2); e outro caso com possível herança digênica (*P3H1* + *WNT1*) (FERNANDES *et al.*, 2020).

- Um caso de OI foi considerado moderado/grave com uma alteração em *WNT1*.

- Os 10 pacientes sem classificação clínica de OI especificada nos artigos, tinham variantes em *IFITM5* (n=7); *P3H1* (n=1); *SERPINF1* (n=1) e *SERPINH1* (n=1).

**Quadro 9 - Variantes reportadas em estudos com pacientes brasileiros**

ID paciente no artigo	Variante	Proteína	Tipo de variante	Zigosidade	Fenótipo reportado	Classificação ACMG	Autor e ano
<i>COL1A1</i>							
<b>MOOI-I 4</b>	c.198_204dup	p.Leu69fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	KANETO <i>et al.</i> , 2014
<b>26</b>	c.316G>T	p.Glu106Ter	<i>Nonsense</i>	Het.	Leve	Patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>30 / F1a</b>	c.334-9A>G	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve – 2 pacientes	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (2 pacientes)
<b>8</b>	c.572delG	p.Gly191fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>48</b>	c.572G>A	p.Gly191Asp	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>26</b>	c.579delT	p.Gly194fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>44</b>	c.581G>T	p.Gly194Val	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>65 / P.1</b>	c.608G>T	p.Gly203Val	<i>Missense</i>	Het.	Moderado - paciente 65 Grave - paciente P.1	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (1 paciente) TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 (1 paciente)
<b>7</b>	c.643-2A >G	-	<i>Splicing</i>	Het.	Grave	Patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>4</b>	c.658C>T	p.Arg220*	<i>Nonsense</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>17 / 47</b>	c.671G>A	p.Gly224Asp	<i>Missense</i>	Het.	Moderado - pacientes 17 e 47	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (2 pacientes)
<b>22</b>	c.748C>T	p.Gln250*	<i>Nonsense</i>	Het.	Moderado	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>63</b>	c.750+2T>G	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>34 / 1</b>	c.757C>T	p.Arg253*	<i>Nonsense</i>	Het.	Leve – 2 pacientes	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (2 pacientes)
<b>39 / 70 / F8a</b>	c.769G>A	p.Gly257Arg	<i>Missense</i>	Het.	Leve - pacientes 39 e F8a Moderado - paciente 70	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (2 pacientes) FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (1 paciente)
<b>F7a</b>	c.809dupT	p.Ser271GlnfsTer16	<i>Frameshift</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020

ID paciente no artigo	Variante	Proteína	Tipo de variante	Zigosidade	Fenótipo reportado	Classificação ACMG	Autor e ano
<i>COL1A1</i>							
<b>21</b>	c.858+1G>T	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>B</b>	c.859G>A	p.Gly287Ser	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	ADUR <i>et al.</i> , 2013
<b>MOOI-III 3</b>	c.869G>A	p.Gly290Glu	<i>Missense</i>	Het.	Grave	VUS	KANETO <i>et al.</i> , 2014
<b>P.2</b>	c.887G>T	p.Gly296Val	<i>Missense</i>	Het.	Leve	Patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>16</b>	c.905G>A	p.Gly302Asp	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>11</b>	c.1003-2A>G	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>31</b>	c.1021_1023dup	p.Gly341dup	<i>In frame</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>P.3</b>	c.1056+1G>A	-	<i>Splicing</i>	Het.	Moderado	Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>67</b>	c.1121G>C	p.Gly374Ala	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>P.4</b>	c.1138G>T	p.Gly380Cys	<i>Missense</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>P.5</b>	c.1165G>T	p.Gly389Cys	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>20</b>	c.1200+1G>C	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>116</b>	c.1201G>A	p.Gly401Ser	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>13</b>	c.120C>A	p.Cys40*	<i>Nonsense</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>28 / 0.4</b>	c.1243C>T	p.Arg415*	<i>Nonsense</i>	Het.	Leve - paciente 28 Moderado - paciente 4	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (1 paciente) REIS <i>et al.</i> , 2005 (1 paciente)
<b>43</b>	c.1249C>G	p.Pro417Ala (ou p.Pro239Ala)	<i>Missense</i>	Het.	Leve	Patogênica	REIS <i>et al.</i> , 2005
<b>32</b>	c.1299+1G>A	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>82</b>	c.1414C>T	p.Arg472*	<i>Nonsense</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023

ID paciente no artigo	Variante	Proteína	Tipo de variante	Zigossidade	Fenótipo reportado	Classificação ACMG	Autor e ano
<i>COL1A1</i>							
<b>57</b>	c.1462-1G>A	-	<i>Splicing</i>	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>109</b>	c.1463G>T	p.Gly488Val	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>F5a</b>	c.1580G>C	p.Gly527Ala	<i>Missense</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>F6a</b>	c.1583G>A / c.3421C>T	p.Arg528His / p.Arg1141Ter	<i>Missense / Nonsense</i>	Het. / Het.	Moderado	Benigna / Patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>52 / 55 / 59 / 111</b>	c.1588G>A	p.Gly530Ser	<i>Missense</i>	Het.	Grave - pacientes 52, 55 e 59 Moderado - paciente 11	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (4 pacientes)
<b>5 / 74 / 104 / C</b>	c.1678G>A	p.Gly560Ser	<i>Missense</i>	Het.	Moderado - todos	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (2 pacientes); REIS <i>et al.</i> , 2005 (1 paciente); ADUR <i>et al.</i> , 2013 (1 paciente)
<b>37</b>	c.1703delC	p.Pro568fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>94</b>	c.1733G>A	p.Gly578Asp	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>54</b>	c.1742G>C	p.Gly581Ala	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>87</b>	c.1821+1G>A	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>P.6</b>	c.1875+1G>C	-	<i>Splicing</i>	Het.	Grave	Patogênica	BARBIRATO <i>et al.</i> , 2009 e TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 (mesmo paciente)
<b>49</b>	c.1876G>A	p.Gly626Ser	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>43</b>	c.1876-1G>T	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>28</b>	c.1886delG	p.Gly629fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Leve	Patogênica	REIS <i>et al.</i> , 2005
<b>14</b>	c.2155G>T	p.Gly719Cys	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>P.7</b>	c.2165G>C	p.Gly722Ala	<i>Missense</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>III-6</b>	c.2209G>T	p.Gly559Cys	<i>Missense</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	PALLOS <i>et al.</i> , 2001

ID paciente no artigo	Variante	Proteína	Tipo de variante	Zigossidade	Fenótipo reportado	Classificação ACMG	Autor e ano
<i>COL1A1</i>							
<b>18 / 19 / 45 / 76 / 112</b>	c.2299G>A	p.Gly767Ser	<i>Missense</i>	Het.	Grave - pacientes 18, 45, 76, 112 Moderado - paciente 19	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (4 pacientes) FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (1 paciente)
<b>28 / 77 / 78 / 114</b>	c.2362G>A	p.Gly788Ser	<i>Missense</i>	Het.	Moderado - pacientes 77, 78, 114 Leve - paciente 28	Provavelmente Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (3 pacientes) FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (1 paciente)
<b>33</b>	c.2308G>A	p.Gly770Ser (ou p.Gly592Ser)	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	REIS <i>et al.</i> , 2005
<b>27</b>	c.2452-2A>G	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>77</b>	c.2480G>A	p.Gly827Asp (ou p.Gly649Asp)	<i>Missense</i>	Het.	Grave II-A	Patogênica	REIS <i>et al.</i> , 2005
<b>P.8</b>	c.2523del	p.Gly842fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Leve	Patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>P.9</b>	c.2559+1G>A	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>4</b>	c.2569G>T	p.Gly857Cys	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>79</b>	c.2570G>C	p.Gly857Ala	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>61 / 95 / 108</b>	c.2596G>A	p.Gly866Ser	<i>Missense</i>	Het.	Grave - todos	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (3 pacientes)
<b>24</b>	c.2612del	p.Pro871LeufsTer237	<i>Frameshift</i>	Het.	Moderado	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>40</b>	c.2667+2T>C	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>P.10</b>	c.2750delG	p.Gly917fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>62</b>	c.3002delG	p.Gly1001fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>24</b>	c.3019G>T	p.Gly1007*	<i>Nonsense</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>73</b>	c.3028G>A	p.Gly1010Ser	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>66</b>	c.3072delT	p.Gly1025fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023

ID paciente no artigo	Variante	Proteína	Tipo de variante	Zigosidade	Fenótipo reportado	Classificação ACMG	Autor e ano
<i>COLIA1</i>							
<b>MOOI-I 1 / 30 / 105</b>	c.3076C>T	p.Arg1026*	<i>Nonsense</i>	Het.	Leve - todos	Patogênica	KANETO <i>et al.</i> , 2014 (1 paciente) HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (2 pacientes)
<b>64</b>	c.3088_3090delCCT	p.Pro1030fs	<i>In frame</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>18 / 25 / 96</b>	c.3118G>A	p.Gly1040Ser	<i>Missense</i>	Het.	Grave - todos	Patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (1 paciente) HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (2 pacientes)
<b>118</b>	c.3154G>A	p.Gly1052Ser	<i>Missense</i>	Het.	Grave	VUS	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>P.11</b>	c.3162delT	p.Gly1055fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Leve	Patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>107</b>	c.3226G>A	p.Gly1076Ser	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>P.12 (IV-1a) / P.13</b>	c.3235G>A	p.Gly1079Ser	<i>Missense</i>	Het.	Leve - todos	Patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 (2 pacientes, sendo o paciente P.12 descrito em outro artigo de MORAES <i>et al.</i> , 2012)
<b>P.14</b>	c.3239delC	p.Pro1080fs	<i>Frameshift</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>74 / 80</b>	c.3505G>A	p.Gly1169Ser	<i>Missense</i>	Het.	Moderado - ambos	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (2 pacientes)
<b>2</b>	c.3839A>C	p.Gln1280Pro	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>15</b>	c.3903C>A	p.Tyr1301*	<i>Nonsense</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>90</b>	c.4321G>T	p.Asp1441Tyr	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<i>COLIA2</i>							
<b>21</b>	c.578G>A	p.Gly193Asp	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>115</b>	c.605G>T	p.Gly202Val	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>F4a</b>	c.686G>A / c.689C>A	p.Gly229Asp / p.Pro230Gln	<i>Missense / Missense</i>	Het. / Het.	Moderado	Provavelmente patogênica / VUS	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>2</b>	c.693+1G>A	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023

ID paciente no artigo	Variante	Proteína	Tipo de variante	Zigosidade	Fenótipo reportado	Classificação ACMG	Autor e ano
<i>COL1A2</i>							
<b>P.15</b>	c.693+2T>C	-	<i>Splicing</i>	Het.	Moderado	Patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>P.16</b>	c.739G>C	p.Gly247Arg	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>D</b>	c.613C>G / c.775G>A	p.P205A / p.Gly259Ser	<i>Missense / Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente benigna / Patogênica	ADUR <i>et al.</i> , 2013
<b>3</b>	c.792+1G>A	-	<i>Splicing</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>83</b>	c.803G>T	p.Gly268Val	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>92</b>	c.812G>A	p.Gly271Asp	<i>Missense</i>	Het.	Leve	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>F2a</b>	c.955G>C	p.Gly319Arg	<i>Missense</i>	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b>56 / 68 / 88</b>	c.964G>T	p.Gly322Cys	<i>Missense</i>	Het.	Moderado - pacientes 68 e 88 Grave - paciente 56	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (3 pacientes)
<b>42 / 11</b>	c.982G>A	p.Gly328Ser	<i>Missense</i>	Het.	Moderado - paciente 11 Grave - paciente 42	Patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (1 paciente) HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (1 paciente)
<b>120</b>	c.982G>C	p.Gly328Arg	<i>Missense</i>	Het.	Letal	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>110</b>	c.1009G>A	p.Gly337Ser	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>35</b>	c.1009G>C	p.Gly337Arg	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>72</b>	c.1010G>A	p.Gly337Asp	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>7</b>	c.1045G>T	p.Gly349Cys	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>58</b>	c.1055G>T	p.Gly352Val	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>117</b>	c.1072G>A	p.Gly358Ser	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>10</b>	c.1100G>A	p.Gly367Glu	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020

ID paciente no artigo	Variante	Proteína	Tipo de variante	Zigosidade	Fenótipo reportado	Classificação ACMG	Autor e ano
<i>COL1A2</i>							
93	c.1127G>A	p.Gly376Asp	Missense	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
12	c.1135G>A	p.Gly379Arg	Missense	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
29	c.1378G>A	p.Gly460Ser	Missense	Het.	Moderado	Patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
75	c.1675G>A	p.Gly559Ser	Missense	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
60	c.1702G>A	p.Gly568Ser	Missense	Het.	Leve	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
113	c.1946G>A	p.Gly649Asp	Missense	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
71	c.2008G>C	p.Gly670Arg	Missense	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
P.17 / 29 / 86	c.2027G>A	p.Gly676Asp	Missense	Het.	Leve - pacientes P.17 e 86 Moderado - paciente 29	Patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 (1 paciente) HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (2 pacientes)
9	c.2108G>T	p.Gly703Val	Missense	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
38	c.2134G>A	p.Gly712Ser	Missense	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
51	c.2252G>T	p.Gly751Val	Missense	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
89	c.2261G>T	p.Gly754Val	Missense	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
23	c.2288G>A	p.Gly763Asp	Missense	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
P.18 / P.19 / F3a / 13 / 25	c.2314G > A	p.Gly772Ser	Missense	Het.	Leve - pacientes P.18, P.19 e F3a Moderado - pacientes 13 e 25	Patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 (2 pacientes) FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (3 pacientes)
14 / 27 / 33 / 36 / 41 / 106 / 119 / 121	c.2341G>A	p.Gly781Ser	Missense	Het.	Leve - pacientes 27,36,106 e 121 Moderado - pacientes 14, 33, 41 e 119	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (8 pacientes)
22	c.2422G>A	p.Gly808Ser	Missense	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023

ID paciente no artigo	Variante	Proteína	Tipo de variante	Zigosidade	Fenótipo reportado	Classificação ACMG	Autor e ano
<b>COLIA2</b>							
<b>P.21</b>	c.2458G>A	p.Gly820Ser	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>MOOI-III 2</b>	c.2503G>A	p.Gly835Ser	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	KANETO <i>et al.</i> , 2014
<b>P.20</b>	c.2565+1G>A	-	<i>Splicing</i>	Het.	Moderado	Patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>50</b>	c.3106G>C	p.Gly1036Arg	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>19</b>	c.3251G>A	p.Gly1084Asp	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>98</b>	c.3269G>A	p.Gly1090Asp	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>P.22</b>	c.3278G>A	p.Gly1093Asp	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>P.23</b>	c.3296G>C	p.Gly1099Ala	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>E</b>	c.3467G>A	p.Arg1156Lys	<i>Missense</i>	Het.	Grave	Provavelmente benigna	ADUR <i>et al.</i> , 2013
<b>6</b>	c.3974G>A	p.Gly1325Glu	<i>Missense</i>	Het.	Leve	VUS	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>IFITM5</b>							
<b>85 / P.24 / 23 / 1 a 7</b>	c.-14C>T	p.Met1ext-5	<i>Start codon</i>	Het.	Moderado - paciente 85 Grave - pacientes P.24 e 23 NA - pacientes 1 a 7	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (1 paciente) TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 (1 paciente) FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (1 paciente) BRIZOLA <i>et al.</i> , 2015 (7 pacientes)
<b>91</b>	c.119C>G	p.Ser40Trp	<i>Missense</i>	Het.	Moderado	VUS	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>CRTAP</b>							
<b>46</b>	c.155T>C	p.Leu52Pro	<i>Missense</i>	Hom.	Grave	VUS	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>P3HI</b>							
<b>100 / 101</b>	c.838C>T	p.Gln280*	<i>Nonsense</i>	Hom.	Grave - paciente 100 NA - paciente 101	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (2 pacientes)

ID paciente no artigo	Variante	Proteína	Tipo de variante	Zigosidade	Fenótipo reportado	Classificação ACMG	Autor e ano
<b><i>P3H1</i></b>							
<b>P.25 (8)</b>	c.1080+1G>T	-	<i>Splicing</i>	Hom.	Grave	Patogênica	BARBIRATO <i>et al.</i> , 2015 e TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 (mesmo paciente) FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (1 paciente)
<b>P / 10</b>	c.1914+1G>C	-	<i>Splicing</i>	Hom.	Grave - ambos	Patogênica	DE SOUZA <i>et al.</i> , 2021 (1 paciente) HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (1 paciente)
<b>P.26(P3)</b>	c.2024G>T	p.Trp675Leu	<i>Missense</i>	Het.	Grave	VUS	BARBIRATO <i>et al.</i> , 2015 e TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 (mesmo paciente)
<b><i>FKBP10</i></b>							
<b>P.27</b>	c.21dupC	p.Ser8fs	<i>Frameshift</i>	Hom.	Moderado	Patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>84 / 97 / 99 / 12</b>	c.179A>C	p.Gln60Pro	<i>Missense</i>	Hom.	Grave - todos	Patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (1 paciente) HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (3 pacientes)
<b>P.28</b>	c.179A>C / c.1063+2T>C	p.Gln60Pro / -	<i>Missense / Splicing</i>	Het.	Moderado	Provavelmente patogênica / Provavelmente patogênica	TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019
<b>69</b>	c.310C>T	p.Arg104*	<i>Nonsense</i>	Hom.	Moderado	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b>3 / P.29</b>	c.831dupC	p.Gly278Argfs	<i>Frameshift</i>	Hom.	Grave - ambos	Patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020 (1 paciente) Barbirato <i>et al.</i> , 2016 e TRANCOZO <i>et al.</i> , 2019 (mesmo paciente)
<b><i>MESD</i></b>							
<b>Pt 1 / Pt4</b>	c.632dupA	p.Lys212GlufsTer19	<i>Frameshift</i>	Hom.	Grave	Patogênica	MOOSA <i>et al.</i> , 2019 (2 pacientes)
<b>Pt 5</b>	c.607611del	p.Thr203AlafsTer26	<i>Frameshift</i>	Hom.	Grave	Patogênica	MOOSA <i>et al.</i> , 2019
<b><i>SERPINF1</i></b>							
<b>III-6 / IX-2 / P</b>	c.1152_1170del	p.Phe384fs	<i>Frameshift</i>	Hom.	Grave – pacientes III-6 / IX-2 Moderado –pc Amorim	Provavelmente patogênica	MINILLO <i>et al.</i> , 2014 (2 pacientes sendo um deles presente em FERNANDES <i>et al.</i> , 2020) AMORIM <i>et al.</i> , 2022
<b>5</b>	c.283+2T>C	-	<i>Splicing</i>	Hom.	Grave	Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020

ID paciente no artigo	Variante	Proteína	Tipo de variante	Zigosidade	Fenótipo reportado	Classificação ACMG	Autor e ano
<b><i>PLOD2</i></b>							
6	c.1682G>A / c.1496_1500del	p.Trp561Ter / p.Glu499AspfsTer29	<i>Nonsense / Frameshift</i>	Het. / Het.	Grave	Provavelmente patogênica / Provavelmente patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
20	c.1639T>C / c.844T>C	p.Tyr547His / p.Cys282Arg	<i>Missense / Missense</i>	Het. / Het.	Moderado	Provavelmente benigna / VUS	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
<b><i>WNT1</i></b>							
	Deleção	-	-	Hom.	Moderado/Grave	Patogênica	NAPOLEÃO <i>et al.</i> , 2022
<b><i>TMEM38B</i></b>							
16	Deleção	-	-	Hom.	Moderado	Patogênica	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
102	c.566G>T	p.Gly189Val	<i>Missense</i>	Hom.	Moderado	VUS	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b><i>P3H1 +WNT1</i></b>							
17	c.349_358del / c.1448G>A	p.Ala117CysfsTer64 / p.Cys483Tyr	Frameshift/ Missense	Het. /Het.	Grave	Provavelmente patogênica / VUS	FERNANDES <i>et al.</i> , 2020
	c.308A>G / c.775_786dup	p.Asn103Thr / p.Gly259_Gly262dup	<i>Missense / In frame</i>	Het. / Het.		VUS / VUS	
<b><i>SERPINH1</i></b>							
103	c.710T>C	p.Met237Thr	<i>Missense</i>	Hom.	NA	Provavelmente patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023
<b><i>PPIB</i></b>							
53 / 80	c.434_435delAA	p.Lys145fs	<i>Frameshift</i>	Hom.	Grave - ambos	Patogênica	HOLTZ <i>et al.</i> , 2023 (2 pacientes)

## 5 DISCUSSÃO

Em nossa casuística, 84,375% dos indivíduos incluídos foram classificados como OI moderada/grave/letal (27/32); 6,25% com OPPG (2/32); 3,1% com STW (1/32) e 6,25% com hipofosfatasia (2/32) conforme diagnóstico clínico-radiológico. Variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em genes associados a doenças monogênicas com diminuição da DMO foram identificadas em 90,62% (29 de 32) desta casuística, sendo 24 casos de OI e 5 casos com os diagnósticos da STW, OPPG e hipofosfatasia. De acordo com nossos objetivos específicos, nos casos inconclusivos ou negativos, buscamos estudar variantes em genes ainda não associados a este fenótipo ósseo pertencentes a vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento ósseo (Wnt e RANKL). Os achados do estudo estão discutidos em três seções. Em 5.1 descrevemos os pacientes com OI, levantamento de casos brasileiros e correlação genótipo-fenótipo. Em 5.2 os indivíduos com outras doenças com baixa DMO que foram observados em nossa casuística e na seção final, discorreremos sobre o aconselhamento genético.

### 5.1 PACIENTES COM OI

A casuística do presente estudo contemplou majoritariamente indivíduos com OI (27/32 – 84,375%), uma das displasias esqueléticas mais prevalentes registradas na literatura, juntamente com o grupo das displasias associadas a variantes em *FGFR3* (MARINI & DANG DO, 2020; BARBOSA-BUCK *et al.*, 2012).

Variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em genes reconhecidamente associados à OI foram identificadas em 24/27 indivíduos (88,89%). Para o probando F27, com hipótese clínica de OI tipo II, a análise molecular foi realizada por um painel customizado (painel 3), com resultado negativo. Não foi possível prosseguir na investigação pela indisponibilidade da família. O indivíduo F4.1 apresentou uma variante (c.2938-70G>A em heterozigose em *COL1A1*) classificada como VUS. A ferramenta *in silico* (SpliceAI) previu um baixo potencial para alteração de *splicing* na região. Neste indivíduo, a realização do sequenciamento do exoma em seus pais, para uma análise de variantes *de novo* e bialélicas no probando, não detectou variantes deletérias em outros genes que pudessem explicar o quadro clínico-radiológico de OI ou em algum gene da via Wnt/RANKL, mas mostrou que a variante intrônica em *COL1A1* era um evento *de novo*. Desta forma, não é possível descartar com certeza

que esta variante não seja responsável pelo fenótipo de OI neste paciente, mas um possível efeito deletério em *COL1A1* causado por esta variante intrônica requer estudos adicionais. Embora no caso F26.1 não tenha sido possível realizar a análise molecular no probando pela indisponibilidade de material coletado para a extração do DNA, o sequenciamento do exoma dos pais, consanguíneos, não evidenciou variantes em heterozigose em genes *CRTAP*, *LEPRE1* e *PP1B* associados às formas recessivas de OI que pudessem estar associadas ao tipo letal, o que sugere que o quadro clínico-radiológico do probando, típico para OI tipo II, fosse decorrente de uma variante *de novo* em um dos genes do colágeno tipo I, os quais são os mais prevalentes neste tipo de OI (VAN DIJK & SILENCE, 2014). Neste cenário, a positividade deste estudo seria de 25/27 (93%), aproximando-se da obtida no estudo de Bardai e colaboradores (BARDAI *et al.*, 2016), ao redor de 98%, refletindo assim o grande conhecimento das bases moleculares da OI.

No Brasil, no estudo mais recente e com o maior número de indivíduos com OI avaliados (156 indivíduos), proveniente de diversas regiões do Brasil, obteve-se uma taxa de positividade de 77,56% empregando um painel customizado com 18 genes. Em 35 pacientes não foram detectadas variantes nesses genes que pudessem explicar o fenótipo (HOLTZ *et al.*, 2023). É possível que os demais pacientes apresentem variantes em genes não contemplados no painel escolhido, seja para as formas raras de OI ou outra doença com baixa DMO, e/ou variantes em genes ainda não descritos associados a OI.

Três variantes identificadas neste estudo não foram reportadas previamente: c.2938-70G>A em *COL1A1*; c.1064G>A: p.(Gly355Glu) em *COL1A2*; c.2108\_2109insTCCTGCTGC: p.(Ala705\_Gly706insAlaProAla) em *COL1A2*.

Em nosso estudo, a maioria dos indivíduos com OI (n=17) apresentavam variantes em *COL1A1* ou *COL1A2* (70,83%). Na literatura, cerca de 85-90% dos casos de OI como um todo se devem a variantes nos genes *COL1A1/2* (MARINI & DANG DO, 2020). A menor frequência de variantes em *COL1A1/2* no presente estudo, aproximadamente 71%, decorre da não inclusão de casos de OI leve. Em nosso levantamento de artigos científicos relatando pacientes brasileiros com OI, 60 foram classificados com um fenótipo leve, todos apresentavam variantes nestes genes (75% em *COL1A1* e 25% em *COL1A2*) (**Quadro 9**). Este achado corrobora com o que foi observado por Bardai e colaboradores (2016) que avaliaram 598 pacientes de diferentes regiões geográficas do mundo que foram atendidos em um hospital no Canadá (BARDAI *et al.*, 2016). O grupo relatou que os casos de OI leve apresentavam alterações somente nestes genes, sendo 3% deles sem variantes observadas. No que diz respeito a OI moderada a severa, tanto nos estudos brasileiros, como no estudo amplo de Bardai e

colaboradores (2016) e Maioli e colaboradores (2019) observou-se uma menor porcentagem de variantes em *COL1A1/2* e maior heterogeneidade alélica nos tipos de OI moderada e grave (MAIOLI *et al.*, 2019). Nos 63 pacientes brasileiros com OI moderada relatados nos artigos coletados, 87,30% dos indivíduos têm alteração em *COL1A1/2*. Já nos casos graves, 67,90% apresentaram variantes em *COL1A1/2* (**Quadro 9**).

No presente estudo, quase 1/3 (8 de 27) dos indivíduos foram classificados como OI tipo II, com óbito neonatal. Os casos letais são poucos reportados no Brasil, sendo o único caso publicado apresentando alteração em *COL1A2* (HOLTZ *et al.*, 2023). Este é o primeiro estudo brasileiro com uma casuística maior de OI tipo II, sendo os indivíduos avaliados apresentando variantes em heterozigose em *COL1A1* (n=3) e *COL1A2* (n=4) (**Quadro 7**).

O colágeno tipo I é uma proteína de estrutura de hélice tripla composta por duas cadeias  $\alpha 1$  (codificada por *COL1A1*) e uma cadeia  $\alpha 2$  (codificada por *COL1A2*) (MARINI *et al.*, 2017). Sua síntese envolve as corretas modificações pós-traducionais, dobramento e secreção. Os resíduos de glicina em cada terceira posição, posicionados centralmente na tripla hélice, são essenciais para o correto dobramento da tripla hélice, pois a glicina é o menor aminoácido e o único que cabe dentro da tripla hélice. Devido a isso, variantes pontuais, como substituições de glicina, em direção à extremidade carboxil-terminal da cadeia  $\alpha 1$ (I) levam a consequências fenotípicas mais graves em comparação com variantes equivalentes mais próximas ao terminal amino (BYERS *et al.*, 1991). Isso é atribuído à exposição do colágeno a modificações pós-traducionais excessivas, como hidroxilação e glicosilação, que ocorrem como resultado do atraso no dobramento da tripla hélice, cuja extensão depende da posição da variante em relação ao terminal carboxil (BYERS *et al.*, 1991; ENGEL & PROCKOP, 1991). Dentre as variantes identificadas nesta casuística em *COL1A1* e *COL1A2*, 82,35% (14/17) consistiam na substituição de uma das glicinas localizadas na tripla hélice por outro aminoácido, caracterizando um defeito qualitativo na proteína.

Segundo estudos *in vitro*, existe uma ordem de acordo com a identidade do resíduo que substitui a glicina levando a maior perda de estabilidade do peptídeo de tripla hélice. A asparagina demonstrou levar a maior desestabilização do peptídeo, seguida da glutamina, valina, arginina, cisteína, serina e por fim, a alanina (BECK *et al.*, 2000; BRYAN *et al.*, 2011). De acordo com a literatura, as substituições mais comuns do aminoácido glicina na tripla hélice são por serina e cisteína, porém, nos casos letais essas substituições são menos comuns. As substituições por valina, asparagina, glutamina e arginina ocorrem com mais frequência em casos letais de OI (MARINI *et al.*, 2007). No presente estudo, em concordância com os dados da literatura, a substituição mais frequente do aminoácido glicina ocorreu pelo aminoácido serina

na casuística global (4/4 em *COL1A1* e 5/10 em *COL1A2*) (**Tabela 7**). Outras substituições envolveram a troca pelos aminoácidos asparagina (2 casos), arginina, cisteína e glutamina em *COL1A2*. Dos casos de OI tipo II, embora na literatura variantes missense ocorrem mais frequentemente no *COL1A1*, neste estudo, dos quatro indivíduos com substituições do aminoácido glicina, três (75%) apresentavam alterações em *COL1A2*, sendo nestes casos as substituições por outros aminoácidos que não a serina (**Figuras 1 e 2**).

Marini e um consórcio de pesquisadores observaram que existem domínios especiais localizados nos genes do colágeno tipo I associados à presença de substituições de glicina que levam às formas mais letais de OI: a) dois trechos de substituições de glicina resultando em desfechos quase exclusivamente letais nas posições helicoidais 691–823 e 910–964 na cadeia alfa1(I) que correspondem as regiões 869-1001 e 1088-1142, respectivamente (*COL1A1*) e b) na cadeia de colágeno alfa2(I), foram descritos oito aglomerados regularmente espaçados contendo mutações letais (**Figuras 1 e 2**). Eles estão concentrados em dois terços da cadeia e correspondem a regiões que desempenham papéis cruciais nas interações entre fibrilas de colágeno e proteoglicanos (MARINI *et al.*, 2007). No presente estudo, esta associação não ocorreu de forma precisa. Os dois casos considerados tipo II com variantes em *COL1A1* não apresentavam variantes nos clusteres designados (**Figura 1**) e em *COL1A2*, apenas um dentre os três com OI tipo II (**Figura 2**). No estudo de base populacional de 166 indivíduos poloneses com suspeita de OI, Sałacińska e colaboradores identificaram seis variantes patogênicas localizadas nas regiões letais destes genes em sete pacientes apresentando fenótipos não letais. Com base nesses resultados, os autores também realizaram uma revisão sistemática de todas as variantes relatadas nas regiões letais para determinar sua mortalidade real e observaram que a mortalidade associada a variantes localizadas nas regiões letais chega a 72% para *COL1A1* e 40% para *COL1A2* (SAŁACIŃSKA *et al.*, 2021).

A penetrância em indivíduos heterozigotos para uma variante patogênica em *COL1A1* ou *COL1A2* é considerada completa, mas com expressividade variável, mesmo entre membros de uma mesma família, tornando o aconselhamento genético complexo, como vemos em alguns casos de variantes identificadas mais de uma vez em diferentes pacientes brasileiros (**Quadro 9**) e nos indivíduos da família F11, com consanguinidade entre os pais do probando. Nesta família foi identificada a variante c.2314G>A (p.Gly772Ser) em heterozigose em *COL1A2* nos genitores, irmã e primos do probando (classificados com OI tipo I ou IV), e em homozigose no probando (com diagnóstico de OI tipo III) (**Quadro 8**). A variante p.Gly772Ser (rs72658185), também conhecida como p.Gly682Ser, foi relatada na literatura em vários indivíduos afetados com OI tipo I (HIGUCHI *et al.*, 2021; TRANCOZO *et al.*, 2019; ZHYTNIK, 2019; LU *et al.*,

2013). O fenótipo pode ser mais grave, como um relato na literatura de uma mulher tailandesa com OI tipo III que apresentava também uma variante em homozigose (c.1009G>A: p.Gly337Ser) em *COLIA2*, enquanto seus pais, heterozigotos, possuíam apenas dentinogênese imperfeita (UDOMCHAIPRASERTKUL *et al.*, 2020).

Outros tipos de variantes identificadas que levam a defeitos qualitativos incluíram três variantes no *splicing* canônico e uma deleção *inframe*, cada uma em um único indivíduo (F3, F4.1, F16 e F10), todos com quadro grave, classificados como OI tipos II ou III (**Quadro 7**). O *splicing* do RNA é essencial para o processamento da transcrição e para a correta síntese de proteínas. Os genes humanos sofrem *splicing* alternativo, portanto diferentes transcritos podem ser gerados. Durante este processo, um sítio de *splicing* críptico pode ser ativado devido às variantes e gerar produtos de *splicing* aberrantes, como já foi descrito em pacientes com OI (SCHLEIT *et al.*, 2015; SCHWARZE *et al.*, 1999). Embora uma variante no sítio de *splicing* canônico possa levar a uma perda de função, sendo que a haploinsuficiência está associada a um quadro leve de OI, o indivíduo F3, com quadro grave de OI apresenta a variante intrônica c.2235+1G>A em heterozigose em *COLIA1*. Esta mesma variante já foi relatada em diversas populações, inclusive em indivíduo com OI tipo III (ANDERSSON *et al.*, 2017; STUBBE *et al.*, 2017; LINDAHL *et al.*, 2015). Nestes casos, o efeito da variante poderia alterar a sequência do DNA, mas manter o quadro de leitura. Desta forma exerceria um efeito dominante negativo, levando a um fenótipo grave de OI (MARINI *et al.*, 2007).

Historicamente, a OI era considerada como uma doença monogênica com um padrão de herança AD, compatível com o predomínio de variantes nos dois genes que codificam o colágeno tipo I (*COLIA1* e *COLIA2*) e a variante recorrente em *IFTM5*. No entanto, existem outros 16 genes, compatíveis com formas AR da doença, e *MBTPS2*, com padrão de herança ligada ao cromossomo X. Muitos desses genes codificam proteínas envolvidas na síntese, transporte e modificações pós-traducionais do próprio colágeno, enquanto outros estão associados à diferenciação e mineralização das células ósseas (FORLINO & MARINI, 2016; GARIBALDI *et al.*, 2022). No geral, estima-se que aproximadamente 10% dos pacientes apresentam variantes patogênicas bialélicas em um destes genes, porém, a frequência dos genes envolvidos nas formas AR de OI pode diferir entre populações específicas, influenciadas pelas taxas de consanguinidade e pelas frequências alélicas das variantes nessas populações (GARIBALDI *et al.*, 2022; BARDAI *et al.*, 2016).

Na tentativa de ampliar o conhecimento sobre essas formas muito raras, recessivas de OI, o presente estudo avaliou formas mais graves desta doença, tendo sido identificados sete probandos (25,92%) com variantes bialélicas em homozigose (n=6) /heterozigose composta

(n=1) em genes relacionados a formas de OI com um padrão de herança AR: *CRTAP* (F19 e F20); *P3H1* (F22), *FKBP10* (F21), *SERPINF1* (F23.1 e F23.2), *MESD* (F24); *CCDC134* (F25), os três primeiros genes associados a defeitos pós-traducional, processamento e *crosslinking* do próprio colágeno. Duas variantes não foram reportadas previamente: c.320\_321del: p.(Arg207Profs\*53) em *CRTAP* e c.419dupC: p.(Arg141ProfsTer5) em *SERPINF1*.

Consanguinidade foi declarada em quatro famílias (F19; F22; F24 e F25) e, em uma delas (F23.1 e F23.2), seus genitores, incluindo a mãe e os pais das duas meninas, eram provenientes da mesma cidade (Tucano-BA), com aproximadamente 50.000 habitantes. Desta forma, a maior proporção de variantes em genes associados às formas AR no presente estudo (25,92%) pode ser explicada pela inclusão apenas de casos graves, com uma alta taxa de consanguinidade/endogamia na amostra (5/27 – 18,5%).

Nos estudos brasileiros descritos na literatura, variantes em dez genes diferentes associadas a formas recessivas de OI foram identificadas, particularmente em *FKBP10* e *P3H1*. Em quatro deles, apenas casos únicos foram reportados (*CRTAP*, *SERPINH1*, *WNT1* e *PPIB*) (**Quadro 9**). No presente estudo, destaca-se a variante *missense* encontrada em *CRTAP* (c.155T>C:p.Leu52Pro) em dois indivíduos (em homozigose no probando F19 e em heterozigose composta no probando F20). Esta variante não está contemplada no banco de dados do LOVD e foi descrita na literatura recentemente em outro indivíduo brasileiro, em homozigose, e classificada como VUS (HOLTZ *et al.*, 2023). As variantes reportadas em indivíduos com OI afetam principalmente o éxon/íntron 1 ou éxon, como no caso aqui descrito, e o éxon/íntron 4 do gene *CRTAP*, acredita-se que inativam completamente o *CRTAP* e resultam em OI muito grave ou letal (tipo II ou III de acordo com a classificação de Sillence) (BALDRIDGE *et al.*, 2008; BARNES *et al.*, 2006; BODIAN *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2010; VAN DIJK *et al.*, 2009). Esta variante está presente em heterozigose em um único indivíduo no banco de dados GnomAD de origem europeia, com uma frequência de 0.000005 e ausente no banco de dados de idosos da população brasileira, indicando ser uma variante extremamente rara.

A interpretação da patogenicidade de uma variante ainda é um desafio, principalmente para aquelas do tipo *missense*, como é o caso da encontrada em *CRTAP*. A variante p.Leu52Pro foi classificada previamente como VUS. O fato de estar presente em homozigose em um indivíduo do presente estudo e em outro em heterozigose composta com uma variante de perda de função (LoF) permitiu classificá-la como provavelmente patogênica, mostrando a

importância de descrições adicionais de variantes muito raras, ainda mais em populações miscigenadas como a encontrada no Brasil.

Em uma análise preliminar, na data atual, esta variante em *CRTAP* destaca-se, juntamente com uma variante em *SERPINF1* e outra em *FKBP10*, como as mais comuns identificadas na população com OI no Brasil. No entanto, novos estudos moleculares em indivíduos brasileiros com OI precisam ser realizados para se obter uma casuística maior e representativa da população brasileira.

O único caso que não tem consanguinidade declarada e a variante é em homozigose é a presente em F21 (c.1207C>T: p.Arg403Ter em *FKBP10*). Embora esta variante já tenha sido reportada em indivíduo de origem europeia, na população brasileira ela não foi detectada previamente. Na tentativa de avaliar melhor esta aparente discordância, levantou-se as seguintes possibilidades: deleção de uma cópia do gene, consanguinidade entre os genitores desconhecida ou dissomia uniparental, mecanismo já reportado para outras doenças recessivas no cromossomo 17, como cistinose (LEBRE *et al.*, 2009), ictiose congênita (ZHANG *et al.*, 2022) e distrofia muscular tipo cinturas (VEREBI *et al.*, 2023). O fato de probando ser portador de 12 variantes raras em homozigose espalhadas pelo genoma dentre 820 no total, com cobertura da região semelhante à de outros indivíduos da mesma corrida, sugere que seus pais compartilhem uma consanguinidade distante.

Dentre os genes reportados mais recentemente, destacam-se os genes *MESD* e *CCDC134*, responsáveis por OI recessiva deformante progressiva grave (tipo III) (MOOSA *et al.*, 2019; DUBAIL *et al.*, 2020; HOLICK *et al.*, 2021).

Variantes bialélicas em *MESD* foram identificadas inicialmente em cinco probandos de famílias consanguíneas clinicamente diagnosticados com um tipo de OI deformante progressiva (MOOSA *et al.*, 2019). Fraturas foram observadas no pré-natal em 2 pacientes, e todos tiveram uma fratura nos primeiros 2 anos de vida. O tratamento com bisfosfonatos, realizado em 4 dos pacientes, não teve sucesso. Três pacientes faleceram por insuficiência respiratória, 2 antes dos 18 meses de idade e 1 aos 17 anos. Os indivíduos afetados mais velhos, quando avaliados com 10 anos e 16 anos, respectivamente, não deambulavam. Escleras azuladas foram observadas nos indivíduos mais jovens, mas não nos mais velhos. Nenhum tinha dentinogênese imperfeita, mas os 3 indivíduos mais velhos tinham dentição desalinhada e/ou oligodontia. Atraso no desenvolvimento global ou evidência de deficiência intelectual estava presente em 3 indivíduos (MOOSA *et al.*, 2019). O paciente incluído em nosso estudo, tem sido acompanhado e não responde bem ao tratamento com bisfosfonatos. O gene *MESD* (OMIM: 607783) codifica a proteína candidata ao desenvolvimento do Mesoderma 2 (*MESD*), chaperona residente do

retículo endoplasmático (ER). Acredita-se que ela desempenhe um papel no dobramento dos co-receptores WNT, proteínas relacionadas ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5 e 6 (LRP5/LRP6) e no acompanhamento de seu trânsito para a superfície celular (TRAN *et al.*, 2021).

Previamente, na literatura, a variante c.2T>C (p.Met1Thr) em homozigose em *CCDC134* foi detectada em três pacientes de duas famílias marroquinas não relacionadas, com fragilidade óssea grave, alta taxa de pseudoartroses e resposta não satisfatória ao tratamento com bisfosfonatos (DUBAIL *et al.*, 2020; HOLICK *et al.*, 2021). O paciente F25 deste estudo, no qual se identificou a mesma variante em homozigose em *CCDC134*, apresentava um quadro ósseo grave, com diversas pseudoartroses e uma resposta não satisfatória ao bisfosfonato. Em adição, observou-se também anomalias na junção craniocervical, um achado mais raro, observado em formas graves de OI. O gene *CCDC134* codifica uma proteína envolvida na regulação da via MAPK, especialmente a fosforilação da proteína quinase regulada por sinal extracelular (Erk) ou c-JUN N-terminal quinase (JUNK). Erk1/2 e JUNK têm importante papel na morfogênese óssea, regulando a deposição de proteínas da matriz extracelular dos osteoblastos em resposta ao estresse. Estudos funcionais hipostenizaram que a o mecanismo de patogenicidade da variante era de perda de função (DUBAIL *et al.*, 2020; HOLICK *et al.*, 2021). No entanto, alguns fatores apontam para a possibilidade de outro mecanismo de patogenicidade, como o fato da mesma variante estar presente em populações distintas e em um indivíduo controle em heterozigose de origem asiática, o fenótipo no modelo de camundongos *knockout* apresenta letalidade na fase embrionária (YU *et al.*, 2018) e a ausência de outras variantes do tipo LoF em outros indivíduos com OI. Pode-se hipotetizar que a variante recorrente no códon de iniciação da tradução atuaria como um alelo hipomórfico com uma função residual que impedia a letalidade. Nesse cenário, a tradução poderia iniciar na próxima metionina (códon 18), mantendo o quadro de leitura, mas perdendo 17 dos 22 aminoácidos que compõem o peptídeo sinal. A perda do peptídeo sinal pode dificultar a localização adequada da proteína e reduzir, mas não abolir, a função da proteína. Portanto, novos estudos funcionais são necessários para caracterizar o patogenicidade desta variante (ALI *et al.*, 2022).

Na comparação dos achados clínicos entre os indivíduos do nosso estudo que apresentavam variantes nos genes do colágeno (*COL1A1/COL1A2*), obteve-se uma diferença estatisticamente significativa nas características da cor da esclera (azuladas/acinzentadas) e na presença de dentinogênese imperfeita, mais prevalente nos indivíduos com variantes em *COL1A1 /COL1A2* (**Quadro 8**), de acordo com os dados da literatura (GARIBALDI *et al.*, 2022).

## 5.2 PACIENTES COM OUTRAS DOENÇAS MONOGÊNICAS COM BAIXA DMO

Variantes em genes associados a outras doenças com baixa DMO foram encontradas no gene *LIFR*, responsável pela STW, no gene *ALPL*, responsável pela hipofostasia e *LRP5*, responsável pela síndrome da OPPG. Dentre as variantes identificadas nestes genes, destacam-se a variante c.1165T>C: p.Trp389Arg no gene *LRP5*, não reportada anteriormente, e a deleção intragênica em *LIFR*, a mesma reportada na literatura em um indivíduo brasileiro (HATAGAMI MARQUES *et al.*, 2015) (**Quadro 7**).

O diagnóstico diferencial de hipofosfatase depende da idade em que os sintomas/sinais se manifestam, podendo ser confundido às vezes com OI. As características clínicas que ajudam a diferenciar a hipofosfatase de outras displasias ósseas incluem achados específicos nas imagens radiológicas (**Figura 5**); concentrações séricas elevadas de cálcio e fósforo no período pós-natal; e atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) sérica baixa (NUNES, 2023). A hipofosfatase perinatal e infantil são geralmente consideradas as formas mais graves e estão associadas a alta mortalidade, especialmente antes da terapia de reposição enzimática. Embora essas classificações sejam úteis para descrever a doença, a apresentação clínica e a gravidade da hipofosfatase (HPP) podem variar amplamente entre os pacientes de acordo com as variantes que estes apresentam (WHYTE, 2017). De acordo com a literatura, a maioria das variantes patogênicas são do tipo *missense* (74,6%), enquanto as demais podem ser do tipo microdeleções, inserções, *splicing*, deleções (NUNES, 2023). Em F31, com diagnóstico de HPP forma infantil, a análise genética revelou que o probando apresentava duas variantes *missense*, ambas localizadas no éxon 3 do gene *ALPL*, sendo uma delas considerada nova. No paciente F32, com o diagnóstico de HPP forma pré-natal benigna, foram identificadas variantes bialélicas em *ALPL*, sendo uma *missense* (c.542C>T: p.Ser181Leu) e uma deleção gênica ainda não reportada na literatura (**Figura 5**). A variante c.542C>T no gene *ALPL* foi previamente descrita em diferentes formas de HPP: em heterozigose composta em um paciente com uma forma infantil de HPP com atividade enzimática residual (LIA-BALDINI *et al.*, 2001); em homozigose em um menino que apresentava uma perda prematura de seus dentes decíduos a partir dos 3 anos de idade, sem história de fraturas ósseas ou dificuldade da marcha (CASALINI *et al.*, 2020); em heterozigose composta em um probando com odonto-HPP (LIU M *et al.*, 2021), demonstrando que a variabilidade fenotípica conforme o genótipo.

Na STW, variantes bialélicas em *LIFR* foram identificadas na maioria dos casos descritos. Até 1996, a STW era considerada letal e embora a sobrevivência do paciente melhore drasticamente após o primeiro ano de vida, o prognóstico geral permanece ruim (KOZLOWSKI

& TENCONI, 1996). Neste estudo, em F28, os achados nos primeiros meses de vida, particularmente hipertermia não relacionada a quadros infecciosos e os achados radiológicos, permitiram a realização do diagnóstico clínico precoce e confirmação posterior pelo estudo molecular. Embora esta criança apresente a mesma variante em homozigose reportada previamente em um indivíduo brasileiro com sobrevida prolongada (HATAGAMI MARQUES *et al.*, 2015), ele foi a óbito por complicações pulmonares com 1 ano e 10 meses (**Quadros 6 e 7**). A hipótese diagnóstica da STW deve ser aventada em fetos/recém-nascidos que apresentam encurvamento dos ossos longos, como um diferencial da OI, mas associado a alargamento metafisário e reforço da cortical (**Figura 5**).

Em nossa casuística dois pacientes com baixa DMO com diagnóstico clínico de OPPG foram incluídos. O probando F29 apresentava as variantes c.3122C>T (p.Thr1041Met) e c.1165T>C (p.Trp389Arg) em heterozigose composta no gene *LRP5*. A variante c.3122C>T foi observada em indivíduos com características clínicas de retinopatia exsudativa AD (LI *et al.*, 2018), porém, até a data do presente trabalho, não foi reportada em indivíduos com OPPG. Já a variante c.1165T>C está ausente no ClinVar, em bancos de dados populacionais e até o momento não foi reportada na literatura em pacientes com OPPG. O nosso probando teve 10 fraturas (a primeira com 2 anos) anomalia ocular diagnosticada com 3 meses, com descolamento da retina e catarata e posterior amaurose. O papel da proteína LRP5 no envolvimento ocular não está completamente elucidado, acredita-se que envolva uma variedade de mecanismos dentro da via de sinalização WNT- $\beta$ -catenina (PAPADOPOULOS *et al.*, 2019). As análises moleculares da probanda F30.1, filha de casal consanguíneo, por NGS e Sanger demonstraram a presença da variante c.3122C>T (p.Thr1041Met) em homozigose em *LRP5*. A variante também foi confirmada em seus genitores (F30.2 e F30.3).

### 5.3 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

O aconselhamento genético é o processo educacional que visa auxiliar os indivíduos afetados e/ou em risco a compreender melhor a natureza de um distúrbio genético, sua transmissão e opções no manejo e planejamento familiar (HARPER, 1998). Uma pesquisa realizada na Finlândia demonstrou que 65% dos pacientes com OI tinham gerações anteriores afetadas (MARINI & DANG DO, 2020). A maioria dos casos *de novo* são variantes *missense*, enquanto a OI herdada é causada principalmente por variantes LoF. Assim como acontece com outras doenças monogênicas do grupo de displasias ósseas, a taxa de incidência de casos de OI “de novo” é relatada como associada à idade paterna avançada (LEE *et al.*, 2006; ZHYTNIK

*et al.*, 2019; XI *et al.*, 2021). O Colégio Americano de Genética Médica definiu a idade paterna avançada como >40 anos na concepção para fins de aconselhamento de risco (TORIELLO *et al.*, 2008).

Embora a OI seja uma doença monogênica com padrões clássicos de herança, em algumas situações estimar o risco de recorrência pode ser um desafio. No presente estudo, em duas famílias (F8 e F14) os probandos apresentavam variantes em heterozigose em *COL1A1/COL1A2*, com genitores sem achados clínicos sugestivos de OI, mas com história de recorrência em irmãos. O mosaïcismo germinativo/somático em um dos genitores é provavelmente o mecanismo responsável pela recorrência de casos graves ou letais em famílias sem outros afetados ou com um dos genitores com achados leves (LUND *et al.*, 1996). De acordo com Marini e Dang Do, o risco de recorrência empírico é de 5-10% para os casais não afetados cujo filho tem OI com padrão AD. Para os casais em que um membro é portador de uma variante em mosaico, o risco de recorrência pode chegar a 50% (MARINI & DANG DO, 2020). Frederiksen e colaboradores (2016), reportaram um caso de OI letal, decorrente de uma variante em heterozigose em *COL1A2*, que levou à descoberta de mosaïcismo parental. A variante apresentada pelo feto não foi detectada na mãe, mas estava presente em seu pai, em uma frequência alélica de 19% e 33% em células bucais e células da saliva, respectivamente. A análise do DNA do sangue total dos avós paternos demonstrou que a variante não estava presente, sugerindo que a mutação ocorreu provavelmente de um evento pós-zigótico *de novo* no pai. Em uma nova gestação, uma análise pré-natal foi feita com 12 semanas de gestação e mostrou que esse feto também era heterozigoto para a mesma variante no gene *COL1A2*. A gravidez foi interrompida com 15 semanas e foi possível observar sinais clínicos de OI no feto. De acordo com os autores, o genitor, um homem de 34 anos com vida ativa e saudável, não apresentava baixa estatura, nem dentinogênese imperfeita tampouco hiper mobilidade articular e/ou hiperelasticidade da pele e as escleras eram de coloração normal (FREDERIKSEN *et al.*, 2016).

A recorrência de OI letal também pode estar relacionada a um padrão de herança AR clássico, com risco de recorrência de 25% em gestações futuras (PYOTT *et al.*, 2011) e, certamente, a consanguinidade entre os pais aumenta o risco de uma criança ter OI recessiva (MARINI & DANG DO, 2020). De forma menos comum, variantes em homozigose em genes de colágeno já foram relatadas em algumas ocasiões (COSTANTINI *et al.*, 2018; DE PAEPE *et al.*, 1997; NICHOLLS *et al.*, 1984; DICKSON *et al.*, 1984).

A fertilidade é preservada em pacientes com OI e há vários relatos de gestações em mulheres com OI. Entretanto, é importante salientar que diversas complicações são relatadas,

incluindo insuficiência respiratória, difícil manejo da anestesia, dor pélvica, maior taxa de parto cesárea e aumento do risco de ruptura uterina (CROPP & MYERS, 1972; RYAN *et al.*, 1989; MAYA *et al.*, 2006; PORSEBORG *et al.*, 1996).

Caso seja confirmada a presença de variante (s) em um dos genitores ou no casal, nas doenças recessivas, pode ser incluído no aconselhamento genético orientações sobre a realização de reprodução assistida e diagnóstico pré-implantacional (Teste Genético Pré-Implantacional para Doenças Monogênicas – PGT-M) em biópsias de trofotoderma de embriões (ZHYTNIK *et al.*, 2019).

Um ponto de destaque é para aquelas variantes classificadas como VUS, não sendo possível afirmar a patogenicidade da variante. No presente estudo, a variante *missense* em *CRTAP* (c.155T>C: p. (Leu52Pro)) reportada previamente como VUS (HOLTZ *et al.*, 2023), foi classificada neste estudo como provavelmente patogênica. Este fato mostra a importância do estudo de indivíduos com doenças raras com um padrão de herança autossômico recessivo em populações miscigenadas, pouco contempladas em bancos públicos populacionais, como é o caso da população brasileira. Uma variante classificada como VUS previamente pode ser reclassificada ao longo do tempo quando novas evidências se tornam disponíveis, confirmando a hipótese clínica e auxiliando no aconselhamento genético.

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo avaliou o espectro fenotípico e genotípico de pacientes brasileiros com doenças monogênicas com baixa DMO atendidos no ICr-HCFMUSP. É o primeiro estudo com pacientes OI moderada/grave/letal majoritariamente na faixa etária pediátrica, correspondendo a 84,375% (27/32) da casuística. Outros diagnósticos clínico-radiológicos com baixa DMO foram a OPPG (2/32), STW (1/32) e hipofosfatase (2/32).

Em relação a OI, os achados clínicos dos pacientes em geral mostraram que as anomalias ósseas estavam presentes em 27 indivíduos (100%), já com prejuízo no comprimento ao nascimento em 23 pacientes (85,19%). Observou-se um agravamento do déficit de crescimento na evolução em 22 (81,48%), com deformidades ósseas em todos os indivíduos (100%) e comprometimento na deambulação em 14 (43,75%). Importante ressaltar que alguns parâmetros não foram avaliados e/ou observados em alguns pacientes, devido ao óbito precoce e/ou pela idade quando foram atendidos, pois se trata de uma casuística com pacientes graves.

A porcentagem de variantes patogênicas e provavelmente patogênicas em genes associados à OI foi de 93%, detecção próxima a observada na literatura, evidenciando o grande conhecimento das bases moleculares desta doença óssea mendeliana.

Pela inclusão de quadros moderados/graves de OI, a porcentagem de variantes patogênicas e provavelmente patogênicas nos genes que codificam o colágeno foi proporcionalmente menor (70,83%) do que outros estudos que incluem casos leves.

Aproximadamente 30% dos indivíduos apresentavam formas recessivas de OI, com variantes em homozigose ou heterozigose composta nos genes *CRTAP*, em 2 indivíduos, e *SERPINF1*, *FKBP10*, *P3H1*, *MESD*, *CCDC134* em um indivíduo cada.

Para a variante missense em *CRTAP* (c.155T>C: p.(Leu52Pro)), previamente reportada como VUS, foi possível reclassificá-la como provavelmente patogênica pela identificação da mesma variante em dois indivíduos não aparentados deste estudo.

Até o presente, os genes mais prevalentes associados a formas recessivas de OI em indivíduos brasileiros são os genes *FKBP10* e *CRTAP*, sendo a variante c.155T>C: p.(Leu52Pro) neste último gene, a mais comum.

Variantes novas, não reportadas na literatura ou banco de dados disponíveis, foram encontradas em cinco pacientes nos genes *COL1A1* (c.2938-70G>A); *COL1A2* (p.Gly355Glu, p.Ala705\_Gly706insAlaProAla); *CRTAP* (p.Arg207Profs\*53); *SERPINF1* (p.Arg141ProfsTer5), ampliando a gama de variantes identificadas em indivíduos brasileiros.

Em aproximadamente 1/3 da casuística, composta por indivíduos classificados com OI tipo II e óbito no período neonatal, as variantes foram identificadas apenas nos genes *COL1A1* e *COL1A2*. Diferente dos dados da literatura, nos quais variantes em *COL1A1* tendem a ser mais graves e associadas a alta letalidade, neste estudo, variantes missense em heterozigose em *COL1A2* excederam em frequência aquelas encontradas em *COL1A1*.

Nos casos inconclusivos ou negativos, não foram identificadas variantes em genes ainda não associados a este fenótipo ósseo pertencentes a vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento ósseo (Wnt e RANKL).

Na tentativa de estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo, observou-se uma diferença estatisticamente significativa na presença de escleras azuladas/acinzentadas e dentinogênese imperfeita, sendo mais prevalente nos indivíduos com variantes nos genes *COL1A1* e *COL1A2* comparados com aqueles que apresentavam as formas recessivas de OI, em concordância com os dados da literatura.

Dentre os indivíduos com outros diagnósticos de doenças com baixa densidade óssea, destaca-se a síndrome de Stüve-Wiedemann pela raridade, gravidade do quadro e a presença da variante do tipo deleção (éxons 15 a 20) em homozigose em *LIFR*, a mesma alteração já encontrada em outro indivíduo da população brasileira, sugerindo um efeito fundador.

Embora a OI e as outras doenças ósseas com baixa DMO avaliadas neste estudo apresentem um padrão clássico de herança mendeliano, desafios são encontrados particularmente na OI, pela grande variabilidade clínica e a possibilidade de mosaicismos somático/gonadal em um dos genitores, como o encontrado em dois casos de recorrência entre irmãos de pais sem características clínicas típicas de OI.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADUR, J. *et al.* The severity of Osteogenesis imperfecta and type I collagen pattern in human skin as determined by nonlinear microscopy: proof of principle of a diagnostic method. **PloS one**, vol. 8, 7 e69186. 15 Jul. 2013, DOI 10.1371/journal.pone.0069186

AI, M. *et al.* Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. **American journal of human genetics**, vol. 77, 5 (2005): 741-53. DOI 10.1086/497706

ALI, T.M. *et al.* The recurrent homozygous translation start site variant in CCDC134 in an individual with severe osteogenesis imperfecta of non-Moroccan ancestry. **American journal of medical genetics. Part A**, vol. 188, 5 (2022): 1545-1549. doi:10.1002/ajmg.a.62651

AMORIM, D.M.R. *et al.* Rare Association Between Osteogenesis Imperfecta and Chondrosarcoma: Could a Pathogenic Variant in the Gene *SERPINF1* Explain It?. **Calcified tissue international**, vol. 112, 1 (2023): 118-122. DOI 10.1007/s00223-022-01033-4

ANDERSSON, K. *et al.*, Mutations in *COL1A1* and *COL1A2* and dental aberrations in children and adolescents with osteogenesis imperfecta - A retrospective cohort study. **PloS one**, vol. 12, 5 e0176466. 12 May. 2017, DOI 10.1371/journal.pone.0176466

ARACI, M.B. *et al.*, Clinical and molecular findings in children and young adults with persistent low alkaline phosphatase concentrations. **Annals of clinical biochemistry**, vol. 58, 4 (2021): 335-341. DOI 10.1177/00045632211000102

Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. **World Health Organization technical report series**, vol. 843 (1994): 1-129.

BALDRIDGE, D. *et al.*, *CRTAP* and *LEPRE1* mutations in recessive osteogenesis imperfecta. **Human mutation**, vol. 29, 12 (2008): 1435-42. DOI 10.1002/humu.20799

BALDWIN, C. T. *et al.* A single base mutation that converts glycine 907 of the alpha 2(I) chain of type I procollagen to aspartate in a lethal variant of osteogenesis imperfecta. The single amino acid substitution near the carboxyl terminus destabilizes the whole triple helix. **The Journal of biological chemistry**, vol. 264, 5 (1989): 3002-6.

BARBIRATO, C. *et al.*, A novel *COL1A1* gene-splicing mutation (c.1875+1G>C) in a Brazilian patient with osteogenesis imperfecta. **Genetics and molecular research: GMR**, vol. 8,1 173-8. 17 Feb. 2009, doi:10.4238/vol8-1gmr563

BARBIRATO, C. *et al.* Analysis of *FKBP10*, *SERPINH1*, and *SERPINF1* genes in patients with osteogenesis imperfecta. **Genetics and molecular research: GMR**, vol. 15,3 10.4238/gmr.15038665. 2 Sep. 2016, DOI 10.4238/gmr.15038665

BARBIRATO, C. *et al.* Mutational characterization of the *P3H1 /CRTAP /CypB* complex in recessive osteogenesis imperfecta. **Genetics and molecular research: GMR**, vol. 14,4 15848-58. 3 Dec. 2015, DOI 10.4238/2015.December.1.36

BARBOSA-BUCK, C. O. *et al.* Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. **American journal of medical genetics. Part A**, vol. 158A,5 (2012): 1038-45. DOI 10.1002/ajmg.a.35246

BARDAI, G. *et al.* DNA sequence analysis in 598 individuals with a clinical diagnosis of osteogenesis imperfecta: diagnostic yield and mutation spectrum. **Osteoporosis international: a journal established as**

**result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA** ,vol. 27,12 (2016): 3607-3613. DOI 10.1007/s00198-016-3709-1

BARNES, A. M. *et al.*Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. **The New England journal of medicine**,vol. 355,26 (2006): 2757-64. DOI 10.1056/NEJMoa063804

BECK, K. *et al.*Destabilization of osteogenesis imperfecta collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 97, 8 (2000): 4273-8. DOI 10.1073/pnas.070050097

BISHOP, N. *et al.*Fracture prediction and the definition of osteoporosis in children and adolescents: the ISCD 2013 Pediatric Official Positions. **Journal of clinical densitometry: the official journal of the International Society for Clinical Densitometry**, vol. 17, 2 (2014): 275-80. DOI 10.1016/j.jocd.2014.01.004

BODIAN, D. L. *et al.*Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships. **Human molecular genetics**, vol. 18, 3 (2009): 463-71. DOI 10.1093/hmg/ddn374

BONAFE, L. *et al.*Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. **American journal of medical genetics. Part A**, vol. 167A, 12 (2015): 2869-92. DOI 10.1002/ajmg.a.37365

BOUDIN, E.; VAN HUL, W. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Genetics of human bone formation. **European journal of endocrinology**, vol. 177, 2 (2017): R69-R83. DOI 10.1530/EJE-16-0990

BRIZOLA, E. *et al.*Clinical and Molecular Characterization of Osteogenesis Imperfecta Type V. **Molecular syndromology**, vol. 6, 4 (2015): 164-72. DOI 10.1159/000439506

BRYAN, M. A. *et al.*Sequence environment of mutation affects stability and folding in collagen model peptides of osteogenesis imperfecta. **Biopolymers**, vol. 96, 1 (2011): 4-13. DOI 10.1002/bip.21432

BYERS, P. H. *et al.*Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. **Journal of medical genetics**, vol. 28, 7 (1991): 433-42. DOI 10.1136/jmg.28.7.433

CASALINI, E. *et al.* Hypophosphatasia: Another Possible Cause of Periarticular Swelling?. **Journal of Clinical and Medical Images**. 2020; V5(5): 1-2

CHANDLER, N. J. *et al.*Lessons learnt from prenatal exome sequencing. **Prenatal diagnosis**, vol. 42, 7 (2022): 831-844. DOI 10.1002/pd.6165.

CHANG, W. *et al.*Prolyl 3-hydroxylase 1 and *CRTAP* are mutually stabilizing in the endoplasmic reticulum collagen prolyl 3-hydroxylation complex. **Human molecular genetics**, vol. 19, 2 (2010): 223-34. DOI 10.1093/hmg/ddp481

CHEN, Yin-Huai *et al.*Absence of GP130 cytokine receptor signaling causes extended Stüve-Wiedemann syndrome. **The Journal of experimental medicine**,vol. 217,3 (2020): e20191306. DOI 10.1084/jem.20191306

CHOI, Y. *et al.*Genotype-phenotype correlations and long-term efficacy of pamidronate therapy in patients with osteogenesis imperfecta. **Annals of pediatric endocrinology & metabolism**,vol. 27,1 (2022): 22-29. DOI 10.6065/apem.2142144.072

CHUN, K. J. Bone densitometry. **Seminars in nuclear medicine**,vol. 41,3 (2011): 220-8. DOI 10.1053/j.semnuclmed.2010.12.002

- CLAEYS, L. *et al.* Collagen transport and related pathways in Osteogenesis Imperfecta. **Human genetics**, vol. 140, 8 (2021): 1121-1141. DOI 10.1007/s00439-021-02302-2
- COSTANTINI, A. *et al.* Autosomal Recessive Osteogenesis Imperfecta Caused by a Novel Homozygous *COL1A2* Mutation. **Calcified tissue international**, vol. 103,3 (2018): 353-358. DOI 10.1007/s00223-018-0414-4
- CROPP, G. J. and MYERS, D. N. Physiological evidence of hypermetabolism in osteogenesis imperfecta. **Pediatrics**, vol. 49,3 (1972): 375-91.
- DATTA, H. K. *et al.* The cell biology of bone metabolism. **Journal of clinical pathology**, vol. 61,5 (2008): 577-87. DOI 10.1136/jcp.2007.048868
- DE PAEPE, A. *et al.* Homozygosity by descent for a *COL1A2* mutation in two sibs with severe osteogenesis imperfecta and mild clinical expression in the heterozygotes. **Human genetics**, vol. 99,4 (1997): 478-83. DOI 10.1007/s004390050392
- DE SOUZA, L.T. *et al.* A new case of osteogenesis imperfecta type VIII and retinal detachment. **American journal of medical genetics. Part A**, vol. 185,1 (2021): 238-241. doi:10.1002/ajmg.a.61934
- DI ROCCO, M. *et al.*, Long-term survival in Stüve-Wiedemann syndrome: a neuro-myo-skeletal disorder with manifestations of dysautonomia. **American journal of medical genetics. Part A**, vol. 118A,4 (2003): 362-8. DOI 10.1002/ajmg.a.10242
- DICKSON, L. A. *et al.* Nuclease S1 mapping of a homozygous mutation in the carboxyl-propeptide-coding region of the pro alpha 2(I) collagen gene in a patient with osteogenesis imperfecta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 81,14 (1984): 4524-8. DOI 10.1073/pnas.81.14.4524
- DONG C. *et al.* A de novo *COL1A2* gene mutation in a fetus with severe osteogenesis imperfect and phenotype-genotype correlation analysis[J]. **Chinese Journal of Evidence -Based Pediatric**, 2016, 11(1): 42-46.
- DUBAIL, J. *et al.* Homozygous Loss-of-Function Mutations in *CCDC134* Are Responsible for a Severe Form of Osteogenesis Imperfecta. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, vol. 35,8 (2020): 1470-1480. DOI 10.1002/jbmr.4011
- EL-GAZZAR, A.; HÖGLER, W. Mechanisms of Bone Fragility: From Osteogenesis Imperfecta to Secondary Osteoporosis. **International journal of molecular sciences**, vol. 22,2 625. 10 Jan. 2021, DOI 10.3390/ijms22020625
- ENGEL, J.; PROCKOP, D.J. The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**, vol. 20 (1991): 137-52. DOI:10.1146/annurev.bb.20.060191.001033
- ESSAWI, O. *et al.* Genetic analysis of osteogenesis imperfecta in the Palestinian population: molecular screening of 49 affected families. **Molecular genetics & genomic medicine**, vol. 6,1 (2018): 15-26. DOI 10.1002/mgg3.331
- FENG, X.; MCDONALD, J. M. Disorders of bone remodeling. **Annual review of pathology**, vol. 6 (2011): 121-45. DOI 10.1146/annurev-pathol-011110-130203
- FERNANDES, A. M. *et al.* The molecular landscape of osteogenesis imperfecta in a Brazilian tertiary service cohort. **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, vol. 31,7 (2020): 1341-1352. DOI 10.1007/s00198-020-05366-4

- FOLKESTAD, L. *et al.* Fracture Rates and Fracture Sites in Patients With Osteogenesis Imperfecta: A Nationwide Register-Based Cohort Study. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, vol. 32,1 (2017): 125-134. DOI 10.1002/jbmr.2920
- FORLINO, Antonella, and MARINI, J.C. Osteogenesis imperfecta. **Lancet (London, England)**, vol. 387, 10028 (2016): 1657-71. DOI 10.1016/S0140-6736(15)00728-X
- FREDERIKSEN, A.L. *et al.* Asymptomatic parental mosaicism for osteogenesis imperfecta associated with a new splice site mutation in *COL1A2*. **Clinical case reports**, vol. 4,10 972-978. 31 Aug. 2016, DOI 10.1002/ccr3.658
- GARIBALDI, N. *et al.* Dissecting the phenotypic variability of osteogenesis imperfecta. **Disease models & mechanisms**, vol. 15,5 (2022): dmm049398. DOI 10.1242/dmm.049398
- GONG, Y *et al.* LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. **Cell**, vol. 107,4 (2001): 513-23. DOI 10.1016/s0092-8674(01)00571-2
- GREGSON, C. L. *et al.* Friend or foe: high bone mineral density on routine bone density scanning, a review of causes and management. **Rheumatology (Oxford, England)**, vol. 52,6 (2013): 968-85. DOI 10.1093/rheumatology/ket007
- HARPER, P. Practical genetic counselling. 5th ed. Woburn, MA: Butterworth Heinemann, 1998:3-4.
- HATAGAMI MARQUES, J. *et al.* Intragenic Deletion in the LIFR Gene in a Long-Term Survivor with Stüve-Wiedemann Syndrome. **Molecular syndromology**, vol. 6,2 (2015): 87-90. DOI 10.1159/000407418
- HAUGE, E. M. *et al.* Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, vol. 16,9 (2001): 1575-82. DOI 10.1359/jbmr.2001.16.9.1575
- HENTHORN, P.S. *et al.* Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 89,20 (1992): 9924-8. DOI 10.1073/pnas.89.20.9924
- HIGUCHI, Y. *et al.* Genetic analysis in Japanese patients with osteogenesis imperfecta: Genotype and phenotype spectra in 96 probands. **Molecular genetics & genomic medicine**, vol. 9, 6 (2021): e1675. DOI 10.1002/mgg3.1675
- HO DUY, B. *et al.* Mutation analysis of the *COL1A1* and *COL1A2* genes in Vietnamese patients with osteogenesis imperfecta. **Human genomics**, vol. 10, 1 27. 12 Aug. 2016, DOI 10.1186/s40246-016-0083-1
- HOLICK, M. F. *et al.* Fetal Fractures in an Infant with Maternal Ehlers-Danlos Syndrome, *CCDC134* Pathogenic Mutation and a Negative Genetic Test for Osteogenesis Imperfecta. **Children (Basel, Switzerland)**, vol. 8,6 512. 17 Jun. 2021, DOI 10.3390/children8060512
- HOLTZ, A.P. *et al.* Genetic analysis of osteogenesis imperfecta in a large Brazilian cohort. **Bone**, vol. 169 (2023): 116683. DOI 10.1016/j.bone.2023.116683
- HOU, R. *et al.* *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics*, vol. 37,5 (2020): 514-518. DOI 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2020.05.005

- JANDL, N. M. *et al.* Genotype-Phenotype Associations in 72 Adults with Suspected ALPL-Associated Hypophosphatasia. **Calcified tissue international**, vol. 108,3 (2021): 288-301. DOI 10.1007/s00223-020-00771-7
- JOVANOVIĆ, M. *et al.* Osteogenesis Imperfecta: Mechanisms and Signaling Pathways Connecting Classical and Rare OI Types. **Endocrine reviews**, vol. 43,1 (2022): 61-90. DOI 10.1210/endo/bnab017
- KANETO, C. M. *et al.* COL1A1 and miR-29b show lower expression levels during osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells from Osteogenesis Imperfecta patients. **BMC medical genetics**, vol. 15 45. 27 Apr. 2014, DOI 10.1186/1471-2350-15-45
- KARASIĆ, D. *et al.* The genetics of bone mass and susceptibility to bone diseases. **Nature reviews. Rheumatology**, vol. 12,6 (2016): 323-34. DOI 10.1038/nrrheum.2016.48
- KAWAKITA, T. *et al.* Pregnancies complicated by maternal osteogenesis imperfecta type III: a case report and review of literature. **Clinical case reports**, vol. 6,7 1252-1257. 21 May. 2018, DOI 10.1002/ccr3.1549
- KHOSHHAL, K.I.; ELLIS, R.D. Effect of lower limb Sofield procedure on ambulation in osteogenesis imperfecta. **Journal of pediatric orthopedics**, vol. 21,2 (2001): 233-5.
- KOZŁOWSKI, K.; TENCONI, R. Stüve-Wiedemann dysplasia in a 3 1/2-year-old boy. **American journal of medical genetics**, vol. 63,1 (1996): 17-9. DOI 10.1002/(SICI)1096-8628(19960503)63:1<17::AID-AJMG6>3.0.CO;2-P
- LAINE, C. M.; LAINE, T. Diagnosis of Osteoporosis in Children and Adolescents. **European endocrinology**, vol. 9,2 (2013): 141-144. DOI 10.17925/EE.2013.09.02.141
- LEBRE, Anne-Sophie *et al.* Maternal uniparental heterodisomy of chromosome 17 in a patient with nephropathic cystinosis. **European journal of human genetics: EJHG**, vol. 17,8 (2009): 1019-23. doi:10.1038/ejhg.2009.13
- LEE, Kwang-Soo *et al.*, Mutational spectrum of type I collagen genes in Korean patients with osteogenesis imperfecta. **Human mutation**, vol. 27,6 (2006): 599. DOI 10.1002/humu.9423
- LI, Jia-Kai *et al.*, Spectrum of Variants in 389 Chinese Proband With Familial Exudative Vitreoretinopathy. **Investigative ophthalmology & visual science**, vol. 59,13 (2018): 5368-5381. DOI 10.1167/iovs.17-23541
- LIA-BALDINI, A. S. *et al.* A molecular approach to dominance in hypophosphatasia. **Human genetics** vol. 109,1 (2001): 99-108. DOI 10.1007/s004390100546
- LINDAHL, K. *et al.*, Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. **European journal of human genetics: EJHG**, vol. 23,8 (2015): 1042-50. DOI 10.1038/ejhg.2015.81
- LIU, M. *et al.*, Clinical and genetic characteristics of hypophosphatasia in Chinese children. **Orphanet journal of rare diseases**, vol. 16,1 159. 7 Apr. 2021, DOI 10.1186/s13023-021-01798-1
- Liu, Yan *et al.*, Prenatal diagnosis of fetal skeletal dysplasia using targeted next-generation sequencing: an analysis of 30 cases. **Diagnostic pathology** vol. 14,1 76. 13 Jul. 2019, DOI 10.1186/s13000-019-0853-x
- LORENTE-RAMOS, R. M. *et al.* Dual energy X-ray absorptimetry: fundamentals, methodology, and clinical applications. **Radiologia**, vol. 54,5 (2012): 410-23. doi:10.1016/j.rx.2011.09.023
- LU, J *et al.* A novel G1006A substitution in the alpha 2(I) chain of type I collagen produces osteogenesis imperfecta type III. **Human mutation** vol. 5,2 (1995): 175-8. DOI 10.1002/humu.1380050212
- LU, Y. *et al.* A rare case of osteogenesis imperfecta combined with complete tooth loss. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM**, vol. 27,1-2 (2014): 143-7. DOI 10.1515/jpem-2013-0069

- LUND, A. M. *et al.* Genetic counselling and prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta caused by paternal mosaicism. **Prenatal diagnosis**, vol. 16,11 (1996): 1032-8. DOI 10.1002/(SICI)1097-0223(199611)16:11<1032: AID-PD984>3.0.CO;2-9
- LUND, A. M. *et al.* Osteogenesis imperfecta: mosaicism and refinement of the genotype-phenotype map in OI type III. Mutations in brief no. 242. Online. **Human mutation**, vol. 13,6 (1999): 503. DOI 10.1002/(SICI)1098-1004(1999)13:6<503: AID-HUMU11>3.0.CO;2-L
- MAIOLI, M. *et al.* Genotype-phenotype correlation study in 364 osteogenesis imperfecta Italian patients. **European journal of human genetics: EJHG**, vol. 27,7 (2019): 1090-1100. DOI 10.1038/s41431-019-0373-x
- MÄKITIE, O. *et al.* Radiographic vertebral morphology: a diagnostic tool in pediatric osteoporosis. **The Journal of paediatrics**, vol. 146,3 (2005): 395-401. DOI 10.1016/j.jpeds.2004.10.052
- MARINI, J. C. *et al.* Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. **Human mutation**, vol. 28,3 (2007): 209-21. DOI 10.1002/humu.20429
- MARINI, J. C. *et al.* Osteogenesis imperfecta. **Nature reviews. Disease primers**, vol. 3 17052. 18 Aug. 2017, DOI 10.1038/nrdp.2017.52
- MARINI, J. C.; DANG DO, A. N. Osteogenesis Imperfecta. **Endotext**, edited by Kenneth R Feingold et. al., MDText.com, Inc., 26 July 2020.
- MAROM, R. *et al.* Osteogenesis imperfecta: an update on clinical features and therapies. **European journal of endocrinology**, vol. 183,4 (2020): R95-R106. DOI 10.1530/EJE-20-0299
- MARR, C. *et al.* Managing the patient with osteogenesis imperfecta: a multidisciplinary approach. **Journal of multidisciplinary healthcare**, vol. 10 145-155. 4 Apr. 2017, DOI 10.2147/JMDH.S113483
- MAYA, D. *et al.* Anesthetic management of a case of osteogenesis imperfect with associated bronchial asthma for repair of corneal perforation. **Indian J. Anaesth.** 50:223–225. 2006.
- MIKELONIS, D. *et al.*, Stüve-Wiedemann syndrome: LIFR and associated cytokines in clinical course and etiology. **Orphanet journal of rare diseases**, vol. 9 34. 12 Mar. 2014, DOI 10.1186/1750-1172-9-34
- MINILLO, R. M. *et al.* Novel Deletion of *SERPINF1* Causes Autosomal Recessive Osteogenesis Imperfecta Type VI in Two Brazilian Families. **Molecular syndromology**, vol. 5,6 (2014): 268-75. DOI 10.1159/000369108
- MOOSA, S. *et al.* Autosomal-Recessive Mutations in *MESD* Cause Osteogenesis Imperfecta. **American journal of human genetics**, vol. 105,4 (2019): 836-843. DOI 10.1016/j.ajhg.2019.08.008
- NAPOLEÃO, R.N.M. *et al.* Apresentação clínica de osteogênese XV em um menino brasileiro de 4 anos / Clinical presentation of osteogenesis imperfecta XV in a four-year-old brazilian boy. **J. Health Biol. Sci. (Online)**; 10(1): 1-4, 01/jan./2022.
- NICHOLLS, A.C. *et al.* The clinical features of homozygous alpha 2(I) collagen deficient osteogenesis imperfecta. **Journal of medical genetics**, vol. 21,4 (1984): 257-62. DOI 10.1136/jmg.21.4.257
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference. **Southern medical journal**, vol. 94, 6 (2001): 569-73.
- NUNES, M. E. Hypophosphatasia. **GeneReviews®**, edited by Margaret P Adam et. al., University of Washington, Seattle, 20 November 2007.

PALLOS, D. *et al.* Novel *COL1A1* mutation (G559C) [correction of G599C] associated with mild osteogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta. **Archives of oral biology**, vol. 46,5 (2001): 459-70. DOI 10.1016/s0003-9969(00)00130-8

PAPADOPOULOS, I. *et al.* Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: clinical, genetic, and treatment-response study of 10 new cases in Greece. **European journal of pediatrics**, vol. 178,3 (2019): 323-329. doi:10.1007/s00431-018-3299-3

PEPIN, M. G. *et al.* Allelic background of *LEPRE1* mutations that cause recessive forms of osteogenesis imperfecta in different populations. **Molecular genetics & genomic medicine** vol. 1,4 (2013): 194-205. DOI 10.1002/mgg3.21

PIZONES, J. *et al.* Delayed Tetraplegia After Thoracolumbar Scoliosis Surgery in Stüve-Wiedemann Syndrome. **Spine deformity**, vol. 1,1 (2013): 72-78. DOI 10.1016/j.jspd.2012.08.001

PLATT, J. *et al.* Points to consider in the clinical use of NGS panels for mitochondrial disease: an analysis of gene inclusion and consent forms. **Journal of genetic counseling**, vol. 23,4 (2014): 594-603. doi:10.1007/s10897-013-9683-2

PORSBORG, P. *et al.* Osteogenesis imperfecta and malignant hyperthermia. Is there a relationship? **Anaesthesia**, vol. 51,9 (1996): 863-5. DOI 10.1111/j.1365-2044.1996.tb12619.x

PYOTT, S. M. *et al.* Recurrence of perinatal lethal osteogenesis imperfecta in sibships: parsing the risk between parental mosaicism for dominant mutations and autosomal recessive inheritance. **Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, vol. 13,2 (2011): 125-30. DOI 10.1097/GIM.0b013e318202e0f6

RALSTON, S. H.; GASTON, M. S. Management of Osteogenesis Imperfecta. **Frontiers in endocrinology**, vol. 10 924. 11 Feb. 2020, DOI 10.3389/fendo.2019.00924

RAUCH, F.; GLORIEUX, F. H. Osteogenesis imperfecta. **Lancet (London, England)**, vol. 363, 9418 (2004): 1377-85. DOI 10.1016/S0140-6736(04)16051-0

REIS, F. C. *et al.* Molecular findings in Brazilian patients with osteogenesis imperfecta. **Journal of applied genetics**, vol. 46, 1 (2005): 105-8.

REIS, F. S. *et al.* A two-year follow-up of asfotase alfa replacement in a patient with hypophosphatasia: clinical, biochemical, and radiological evaluation. **Archives of endocrinology and metabolism**, vol. 64,5 (2021): 623-629. doi:10.20945/2359-3997000000222

RICHARDS, S. *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. **Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, vol. 17,5 (2015): 405-24. DOI 10.1038/gim.2015.30

ROCHA-BRAZ, M.G.; FERRAZ-DE-SOUZA, B. Genetics of osteoporosis: searching for candidate genes for bone fragility. **Arch Endocrinol Metab.** 2016 Aug;60(4):391-401. DOI 10.1590/2359-3997000000178. PMID: 27533615.

ROMEO-BERTOLA, D. *et al.*, Stüve-Wiedemann Syndrome: Update on Clinical and Genetic Aspects. **Molecular syndromology**, vol. 7,1 (2016): 12-8. DOI 10.1159/000444729

RYAN, C. A. *et al.* Osteogenesis imperfecta and hyperthermia. **Anesthesia and analgesia**, vol. 68,6 (1989): 811-4.

- SALACIŃSKA, K. *et al.* Novel Mutations Within Collagen Alpha1(I) and Alpha2(I) Ligand-Binding Sites, Broadening the Spectrum of Osteogenesis Imperfecta - Current Insights Into Collagen Type I Lethal Regions. **Frontiers in genetics**, vol. 12 692978. 9 Jul. 2021, DOI 10.3389/fgene.2021.692978
- SARAUX, H. *et al.* Pseudo-gliome et fragilité osseuse héréditaire à transmission autosomale récessive. **Ann Oculaire (Paris)** 1967; 200:1241–52.
- SCHLEIT, J. *et al.* Molecular Outcome, Prediction, and Clinical Consequences of Splice Variants in *COL1A1*, Which Encodes the pro $\alpha$ 1 (I) Chains of Type I Procollagen. **Human mutation**, vol. 36,7 (2015): 728-39. DOI 10.1002/humu.22812
- SCHWARZE, U. *et al.* Redefinition of exon 7 in the *COL1A1* gene of type I collagen by an intron 8 splice-donor-site mutation in a form of osteogenesis imperfecta: influence of intron splice order on outcome of splice-site mutation. **American journal of human genetics**, vol. 65,2 (1999): 336-44. DOI 10.1086/302512
- SHAPIRO, J. R. *et al.* Pulmonary hypoplasia and osteogenesis imperfecta type II with defective synthesis of alpha I(1) procollagen. **Bone**, vol. 10,3 (1989): 165-71. DOI 10.1016/8756-3282(89)90049-5
- SIGURDSSON, G. *et al.* Impact of genetics on low bone mass in adults. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, vol. 23, 10 (2008): 1584-90. DOI 10.1359/jbmr.080507
- SILLENCE, D. O. *et al.* Osteogenesis imperfecta type III. Delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity. **American journal of medical genetics**, vol. 23,3 (1986): 821-32. DOI:10.1002/ajmg.1320230309
- SILLENCE, D.O. *et al.*, Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. **Journal of medical genetics**, vol. 16,2 (1979): 101-16. DOI 10.1136/jmg.16.2.101
- STEINER, R.D.; BASEL, D. *COL1A1/2* Osteogenesis Imperfecta. In: **GeneReviews® [Internet]**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.2005 Jan 28 [updated 2021 May 6].
- STEINLEIN, O. K. *et al.* Mutations in *FKBP10* can cause a severe form of isolated Osteogenesis imperfecta. **BMC medical genetics**, vol. 12 152. 22 Nov. 2011, DOI 10.1186/1471-2350-12-152
- STUBBE, A. *et al.* Molecular genetics analysis of osteogenesis imperfecta in clinical practice. **Paediatrica Croatica**. 2017;61(3):141-146 <https://doi.org/10.13112/PC.2017.21>
- STÜVE, A.; WIEDEMANN, H. R. Congenital bowing of the long bones in two sisters. **Lancet (London, England)**, vol. 2, 7722 (1971): 495. DOI 10.1016/s0140-6736(71)92666-3
- TAUER, J. T. *et al.*, Osteogenesis Imperfecta: New Perspectives from Clinical and Translational Research. **JBMR plus**, vol. 3,8 e10174. 20 Feb. 2019, DOI 10.1002/jbm4.10174
- TORIELLO, H.V. *et al.*, Statement on guidance for genetic counseling in advanced paternal age. **Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, vol. 10,6 (2008): 457-60. DOI:10.1097/GIM.0b013e318176fabb
- TRAN, T. T. *et al.* Biallelic variants in *MESD*, which encodes a WNT-signaling-related protein, in four new families with recessively inherited osteogenesis imperfecta. **HGG advances**, vol. 2,4 100051. 20 Aug. 2021, DOI 10.1016/j.xhgg.2021.100051
- TRANCOZO, M. *et al.* Osteogenesis imperfecta in Brazilian patients. **Genetics and molecular biology**, vol. 42,2 (2019): 344-350. DOI 10.1590/1678-4685-GMB-2018-0043

- UDOMCHAIPRASERTKUL, W. *et al.* A family with homozygous and heterozygous p.Gly337Ser mutations in *COL1A2*. **European journal of medical genetics**, vol. 63,6 (2020): 103896. DOI 10.1016/j.ejmg.2020.103896
- UMAIR, Muhammad *et al.* Homozygous sequence variants in the FKBP10 gene underlie osteogenesis imperfecta in consanguineous families. **Journal of human genetics**, vol. 61,3 (2016): 207-13. DOI:10.1038/jhg.2015.129
- UNGER, S. *et al.*, Nosology of genetic skeletal disorders: 2023 revision. **American journal of medical genetics. Part A**, vol. 191,5 (2023): 1164-1209. doi:10.1002/ajmg.a.63132
- VAN DIJK, F.S. *et al.*, *CRTAP* mutations in lethal and severe osteogenesis imperfecta: the importance of combining biochemical and molecular genetic analysis. **European journal of human genetics: EJHG**, vol. 17,12 (2009): 1560-9. DOI 10.1038/ejhg.2009.75
- VAN DIJK, F.S.; SILLENCE, D.O. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. **American journal of medical genetics. Part A**, vol. 164A,6 (2014): 1470-81. DOI 10.1002/ajmg.a.36545
- VEREBI, C. *et al.*, How a paternal uniparental isodisomy of chromosome 17 leads to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy R3. **Neuromuscular disorders: NMD**, vol. 33,5 (2023): 367-370. doi:10.1016/j.nmd.2023.03.004
- WANG, J. *et al.*, Identification of gene mutation in patients with osteogenesis imperfect using high resolution melting analysis. **Scientific reports**, vol. 5 13468. 26 Aug. 2015, DOI 10.1038/srep13468
- WARMAN, M. L. *et al.*, Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. **American journal of medical genetics. Part A**, vol. 155A,5 (2011): 943-68. DOI 10.1002/ajmg.a.33909
- WHYTE, M. P. Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. **Nature reviews. Endocrinology**, vol. 12,4 (2016): 233-46. DOI:10.1038/nrendo.2016.14
- WHYTE, M. P. Hypophosphatasia: An overview For 2017. **Bone**, vol. 102 (2017): 15-25. DOI 10.1016/j.bone.2017.02.011
- WIEDEMANN, H. R.; STÜVE, A. Stüve-Wiedemann syndrome: update and historical footnote. **American journal of medical genetics**, vol. 63,1 (1996): 12-6. DOI 10.1002/(SICI)1096-8628(19960503)63:1<12::AID-AJMG5>3.0.CO;2-U
- XI, L. *et al.* Clinical and genetic analysis in 185 Chinese probands of osteogenesis imperfecta. **Journal of bone and mineral metabolism**, vol. 39,3 (2021): 416-422. DOI 10.1007/s00774-020-01163-5
- YIN, X. *et al.* Identification of a de novo fetal variant in osteogenesis imperfecta by targeted sequencing-based noninvasive prenatal testing. **Journal of human genetics**, vol. 63,11 (2018): 1129-1137. DOI 10.1038/s10038-018-0489-9
- YOHE, S.; THYAGARAJAN, B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. **Archives of pathology & laboratory medicine** vol. 141,11 (2017): 1544-1557. DOI 10.5858/arpa.2016-0501-RA
- YU, B. *et al.* CCDC134 serves a crucial role in embryonic development. **International journal of molecular medicine**, vol. 41,1 (2018): 381-390. doi:10.3892/ijmm.2017.3196
- ZHANG, L. *et al.* Identification of the first congenital ichthyosis case caused by a homozygous deletion in the *ALOX12B* gene due to chromosome 17 mixed uniparental disomy. **Frontiers in genetics**, vol. 13 931833. 8 Aug. 2022, doi:10.3389/fgene.2022.931833
- ZHONG, Y. *et al.* Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. **Annals of laboratory medicine**, vol. 41,1 (2021): 25-43. DOI 10.3343/alm.2021.41.1.25

ZHYTNIK, L. *et al.* Reproductive options for families at risk of Osteogenesis Imperfecta: a review. **Orphanet journal of rare diseases**, vol. 15,1 128. 27 May. 2020, DOI 10.1186/s13023-020-01404-w

Zhytnik, L. *et al.* *COL1A1* /2 Pathogenic Variants and Phenotype Characteristics in Ukrainian Osteogenesis Imperfecta Patients. **Frontiers in genetics**, vol. 10 722. 9 Aug. 2019, DOI 10.3389/fgene.2019.00722

ZHYTNIK, L. *et al.* De novo and inherited pathogenic variants in collagen-related osteogenesis imperfecta. **Molecular genetics & genomic medicine**, vol. 7,3 (2019): e559. DOI 10.1002/mgg3.559

## 8 ANEXOS

## Anexo I: Lista de 230 genes do painel NGS 'P1'

Gene (HGNC)	Número MIM										
AARS	601065	CRYAB	123590	FXN	606829	LEMD3	607844	POMGNT1	606822	SHOX	312865
ACP5	171640	CTSK	601105	GABRA5	137142	LFNG	602576	POMT1	607423	SLC17A6	607563
ACTA1	102610	CUL7	609577	GABRB3	137192	LIFR	151443	POMT2	607439	SLC25A12	603667
ADAMTSL2	612277	CYFIP1	606322	GABRG1	137166	LITAF	603795	POR	124015	SLC26A2	606718
ALPL	171760	CYP7B1	603711	GADI1	605363	LMNA	150330	PPIB	123841	SLC6A4	182138
ALX1	601527	DAG1	128239	GAD2	138275	LRP5	603506	PRKCA	176960	SLC9A6	300231
ALX3	606014	DDR2	191311	GALNS	612222	LRSAM1	610933	PRPS1	311850	SMARCAL1	606622
ALX4	605420	DES	125660	GARS	600287	MAOA	309850	PRX	605725	SOST	605740
APTX	606350	DIAPH3	614567	GCH1	600225	MAPK3	601795	PTEN	601728	SOX9	608160
ASMT	300015	DLL3	602768	GDAP1	606598	MARK1	606511	PTH1R	168468	SP7	606633
ASPA	608034	DMD	300377	GDF5	601146	MATN3	602109	RAB23	606144	SPAST	604277
ASTN2	612856	DNAJB6	611332	GDF6	601147	MBD2	603547	RAB7A	602298	SPG11	610844
ATL1	606439	DNM2	602378	GJA1	121014	MDGA2	611128	RAI1	607642	SPG7	602783
BCL2	151430	DPP10	608209	GJB1	304040	MECP2	300005	RBFOX1	605104	SRY	480000
BDNF	113505	DRD4	126452	GLB1	611458	MED25	610197	RECQL4	603780	STS	300747
BIN1	601248	DYM	607461	GLI3	165240	MESP2	605195	REEP1	609139	STXBP6	607958
CACNA1C	114205	DYNC1H1	600112	GNAS	139320	MET	164860	RELN	600514	TCAP	604488
CACNA1H	607904	DYNC2H1	603297	GPR85	605188	MFN2	608507	RIC3	610509	TCOF1	606847
CAPN3	114240	DYSF	603009	GRIA3	305915	MMP13	600108	RMRP	157660	TGFBR1	190181
CAV3	601253	EGR2	129010	GRIK2	138244	MMP9	120361	RUNX2	600211	TGFBR2	190182
CFTR	602421	EIF2AK3	604032	GRIN2A	138253	MPZ	159440	RYR1	180901	TNFRSF11A	603499
CHRNA7	118511	EMD	300384	GRM5	604102	MSX2	123101	SACS	604490	TP63	603273
CHRND	100720	EN2	131310	GRM8	601116	MTM1	300415	SALL1	602218	TPM2	190990
CHRNA7	100730	ERBB4	600543	GRPR	305670	MTMR2	603557	SBDS	607444	TPM3	191030
CHST3	603799	ERG	165080	HES7	608059	MYOT	604103	SBF2	607697	TRAPPC2	300202
CLCN1	118425	EVC	604831	HOXA1	142955	NDRG1	605262	SCN1A	182389	TRIP11	604505
CNTN4	607280	EVC2	607261	HSPB1	602195	NEFL	162280	SELENON	606210	TRPV4	605427
CNTNAP2	604569	FBN1	134797	HSPB8	608014	NIPA1	608145	SEMA3A	603961	TWIST1	601622
COL10A1	120110	FGD4	611104	IFT80	611177	NKX3-2	602183	SEMA5A	609297	UBE3A	601623
COL11A1	120280	FGFR1	136350	IL11RA	600939	NLGN3	300336	SERPINH1	600943	ZNF778	.
COL11A2	120290	FGFR2	176943	IMMP2L	605977	NLGN4X	300427	SETX	608465		
COL18A1	120328	FGFR3	134934	ITGB3	173470	NOG	602991	SEZ6L2	616667		
COL1A1	120150	FHL1	300163	JAG1	601920	NOTCH3	600276	SGCA	600119		
COL1A2	120160	FIG4	609390	JAK2	147796	NPR2	108961	SGCB	600900		
COL2A1	120140	FKBP10	607063	KIF1B	605995	NRXN1	600565	SGCD	601411		
COL9A1	120210	FKRP	606596	KIF5A	602821	NSD1	606681	SGCG	608896		
COL9A2	120260	FKTN	607440	L1CAM	308840	P3H1	610339	SH3BP2	602104		
COL9A3	120270	FLNA	300017	LAMA2	156225	PAFAH1B1	601545	SH3TC2	608206		
COMP	600310	FLNB	603381	LAMB1	150240	PCDH19	300460	SHANK2	603290		
CRTAP	605497	FOXP2	605317	LARGE1	603590	PMP22	601097	SHANK3	606230		

## Anexo II: Lista de 465 genes do painel NGS 'P2'

Gene (HGNC)	Número MIM										
AARS	601065	BMPRIA	601299	COL6A2	120240	DYSF	603009	FMRI	309550	HSPB1	602195
ABCD1	300371	BRCA1	113705	COL6A3	120250	EFNB1	300035	FOLR1	136430	HSPB8	608014
ACADM	607008	BRCA2	600185	COL9A1	120210	EGR2	129010	FOXE1	602617	IDUA	252800
ACADVL	609575	BRIP1	605882	COL9A2	120260	EIF2AK3	604032	FOXG1	164874	IFT80	611177
ACAT1	607809	BTBD	609019	COL9A3	120270	ELN	130160	FOXP2	605317	IL11RA	600939
ACP5	171640	CACNAIS	114208	COMP	600310	EMD	300384	FTCD	606806	IL2RG	308380
ACTA1	102610	CANT1	613165	COQ2	609825	EPCAM	185535	FUS	137070	IL7R	146661
ADA	608958	CAPN3	114240	COQ8A	606980	EPHA3	179611	FXN	606829	IRF6	607199
ADAMTS18	607512	CAV3	601253	COQ9	612837	ERF	611888	GADD45G	604949	ITGA7	600536
ADAMTSL2	612277	CBS	613381	CP	117700	ERG	165080	GALNS	612222	IVD	607036
AFG3L2	604581	CD3D	186790	CPS1	608307	ETHE1	608451	GALNT1	602273	JAG1	601920
ALDH3A2	609523	CD3E	186830	CREBBP	600140	EVC	604831	GALNT12	610290	JAK3	600173
ALDH7A1	107323	CDH1	192090	CRISPLD2	612434	EVC2	607261	GALT	606999	JAM2	606870
ALPL	171760	CDH2	114020	CRTAP	605497	EXO1	606063	GAMT	601240	KANSL1	612452
ALX1	601527	CDH23	605516	CRYAA	123580	EXT1	608177	GARS	600287	KATNAL2	614697
ALX3	606014	CDH7	605806	CRYAB	123590	FAF1	604460	GATM	602360	KCNE1	176261
ALX4	605420	CDH8	603008	CTDP1	604927	FAH	613871	GCDH	608801	KIF22	603213
AMN	605799	CDK4	123829	CTNNB1	116806	FANCA	607139	GCH1	600225	KIF5A	602821
ANO5	608662	CDKL5	300203	CTSK	601105	FANCC	613899	GDAP1	606598	L1CAM	308840
APC	611731	CDKN2A	600160	CUBN	602997	FANCD2	613984	GDF5	601146	LAMA2	156225
APTX	606350	CFTR	602421	CUL7	609577	FANCE	613976	GDF6	601147	LAMP2	309060
ARG1	608313	CHEK2	604373	CYP21A2	613815	FANCF	613897	GIF	609342	LARGE1	603590
ARHGAP29	610496	CHST14	608429	CYP27A1	606530	FANCG	602956	GJA1	121014	LEMD3	607844
ARX	300382	CHST3	603799	CYP7B1	603711	FBLN5	604580	GJB1	304040	LFNG	602576
ASL	608310	CLCN1	118425	DAG1	128239	FBN1	134797	GJB2	121011	LIFR	151443
ASPA	608034	CLDN14	605608	DBT	248610	FECH	612386	GJB3	603324	LIP1	609252
ASS1	603470	CLPTMIL	612585	DCLRE1C	605988	FGD4	611104	GJB6	604418	LITAF	603795
ATL1	606439	CLRN1	606397	DDR2	191311	FGF8	600483	GLB1	611458	LMAN1	601567
ATM	607585	CNTNAP2	604569	DES	125660	FGFR1	136350	GLI2	165230	LMBRD1	612625
ATP7A	300011	COL10A1	120110	DHCR24	606418	FGFR2	176943	GLI3	165240	LMNA	150330
ATP7B	606882	COL11A1	120280	DHCR7	602858	FGFR3	134934	GNAI3	139370	LRP5	603506
ATR	601215	COL11A2	120290	DLAT	608770	FHL1	300163	GNAS	139320	LRSAM1	610933
AXIN2	604025	COL18A1	120328	DLL3	602768	FIG4	609390	GRIK1	138245	MATN3	602109
B4GALT6	604017	COL1A1	120150	DMD	300377	FILIP1L	612993	HADHA	600890	MBD2	603547
BAP1	603089	COL1A2	120160	DNAJB6	611332	FKBP10	607063	HADHB	143450	MBD5	611472
BARD1	601593	COL2A1	120140	DNM2	602378	FKBP14	614505	HBB	141900	MC2R	607397
BCKDHA	608348	COL3A1	120180	DUOX2	606759	FKRP	606596	HERC2	605837	MCCC1	609010
BCKDHB	248611	COL5A1	120215	DYM	607461	FKTN	607440	HES7	608059	MCCC2	609014
BINI	601248	COL5A2	120190	DYNC2H1	603297	FLNA	300017	HLC5	609018	MECP2	300005
BMP4	112262	COL6A1	120220	DYRK1A	600855	FLNB	603381	HMGCL	613898	MED25	610197

## Anexo II: Lista de 465 genes do painel NGS 'P2', continuação

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
<i>MEN1</i>	613733	<i>NAGS</i>	608300	<i>PDSS1</i>	607429	<i>RAG2</i>	179616	<i>SLC25A15</i>	603861	<i>TP53</i>	191170
<i>MESP2</i>	605195	<i>NBN</i>	602667	<i>PDSS2</i>	610564	<i>RAI1</i>	607642	<i>SLC26A2</i>	606718	<i>TP63</i>	603273
<i>MFN2</i>	608507	<i>NDN</i>	602117	<i>PFKL</i>	171860	<i>RARA</i>	180240	<i>SLC26A4</i>	605646	<i>TPM2</i>	190990
<i>MID1</i>	300552	<i>NDRG1</i>	605262	<i>PHF8</i>	300560	<i>RBBP8</i>	604124	<i>SLC2A1</i>	138140	<i>TPM3</i>	191030
<i>MIR1205</i>		<i>NDUFV2</i>	600532	<i>PHGDH</i>	606879	<i>RECQL4</i>	603780	<i>SLC5A5</i>	601843	<i>TPO</i>	606765
<i>MIR1206</i>		<i>NECTIN1</i>	600644	<i>PLCB4</i>	600810	<i>REEP1</i>	609139	<i>SMAD4</i>	600993	<i>TRAPPC2</i>	300202
<i>MIR1207</i>		<i>NEFL</i>	162280	<i>PLOD1</i>	153454	<i>RET</i>	164761	<i>SMARCAL1</i>	606622	<i>TRIM32</i>	602290
<i>MIR1208</i>		<i>NF1</i>	613113	<i>PMP22</i>	601097	<i>RGMA</i>	607362	<i>SNAP29</i>	604202	<i>TRIP11</i>	604505
<i>MIR140</i>	611894	<i>NIPA1</i>	608145	<i>PMS1</i>	600258	<i>RHD</i>	111680	<i>SNRPN</i>	182279	<i>TRPC6</i>	603652
<i>MIR200B</i>	612091	<i>NIPBL</i>	608667	<i>PMS2</i>	600259	<i>RMRP</i>	157660	<i>SOD1</i>	147450	<i>TRPS1</i>	604386
<i>MLH1</i>	120436	<i>NKX3-2</i>	602183	<i>POGZ</i>	614787	<i>ROR2</i>	602337	<i>SOST</i>	605740	<i>TRPV4</i>	605427
<i>MMAA</i>	607481	<i>NOG</i>	602991	<i>POLRIC</i>	610060	<i>RPS27L</i>	612055	<i>SOX9</i>	608160	<i>TSC1</i>	605284
<i>MMAB</i>	607568	<i>NOL8</i>	611534	<i>POLRID</i>	613715	<i>RTTN</i>	610436	<i>SP7</i>	606633	<i>TSC2</i>	191092
<i>MMACHC</i>	609831	<i>NOTCH3</i>	600276	<i>POMGNT1</i>	606822	<i>RUNX1</i>	151385	<i>SPAST</i>	604277	<i>TSHB</i>	188540
<i>MMADHC</i>	611935	<i>NPC1</i>	607623	<i>POMT1</i>	607423	<i>RUNX2</i>	600211	<i>SPG11</i>	610844	<i>TSHR</i>	603372
<i>MMP13</i>	600108	<i>NPC2</i>	601015	<i>POMT2</i>	607439	<i>RYR1</i>	180901	<i>SPG7</i>	602783	<i>TSHZ1</i>	614427
<i>MMP9</i>	120361	<i>NPR2</i>	108961	<i>POR</i>	124015	<i>SALL1</i>	602218	<i>SPR</i>	182125	<i>TSPEAR</i>	612920
<i>MOCS1</i>	603707	<i>NSD1</i>	606681	<i>POTED</i>	607549	<i>SATB2</i>	608148	<i>SRY</i>	480000	<i>TWIST1</i>	601622
<i>MOCS2</i>	603708	<i>NT5C3A</i>	606224	<i>PPIB</i>	123841	<i>SBDS</i>	607444	<i>STK11</i>	602216	<i>UBE3A</i>	601623
<i>MPZ</i>	159440	<i>NTNG1</i>	608818	<i>PQBPI</i>	300463	<i>SBF2</i>	607697	<i>SUMO1</i>	601912	<i>USH1C</i>	605242
<i>MRAP</i>	609196	<i>OFD1</i>	300170	<i>PRPS1</i>	311850	<i>SCN4A</i>	603967	<i>TARDBP</i>	605078	<i>USH1G</i>	607696
<i>MRE11</i>	600814	<i>OGN</i>	602383	<i>PRSS1</i>	276000	<i>SCO2</i>	604272	<i>TBX1</i>	602054	<i>USH2A</i>	608400
<i>MSH2</i>	609309	<i>OTC</i>	300461	<i>PRX</i>	605725	<i>SELENON</i>	606210	<i>TBX22</i>	300307	<i>USHBP1</i>	611810
<i>MSH3</i>	600887	<i>OTOF</i>	603681	<i>PSAT1</i>	610936	<i>SERPINH1</i>	600943	<i>TCAP</i>	604488	<i>USP25</i>	
<i>MSH6</i>	600678	<i>OXCT1</i>	601424	<i>PSPH</i>	172480	<i>SETBP1</i>	611060	<i>TCF12</i>	600480	<i>VAPB</i>	605704
<i>MSTN</i>	601788	<i>P3H1</i>	610339	<i>PTCH1</i>	601309	<i>SETX</i>	608465	<i>TCF4</i>	602272	<i>VHL</i>	608537
<i>MSX1</i>	142983	<i>PABPN1</i>	602279	<i>PTEN</i>	601728	<i>SGCA</i>	600119	<i>TCOF1</i>	606847	<i>WHRN</i>	607928
<i>MSX2</i>	123101	<i>PAFAH1B1</i>	601545	<i>PTH1R</i>	168468	<i>SGCB</i>	600900	<i>TERT</i>	187270	<i>WNT3</i>	165330
<i>MTHFR</i>	607093	<i>PAH</i>	612349	<i>PTS</i>	612719	<i>SGCD</i>	601411	<i>TFAP2A</i>	107580	<i>XRCC3</i>	600675
<i>MTM1</i>	300415	<i>PALB2</i>	610355	<i>PVT1</i>	165140	<i>SGCG</i>	608896	<i>TG</i>	188450	<i>ZAP70</i>	176947
<i>MTMR2</i>	603557	<i>PAPSS2</i>	603005	<i>PYGM</i>	608455	<i>SH3BP2</i>	602104	<i>TGFBR1</i>	190181		
<i>MTR</i>	156570	<i>PAX8</i>	167415	<i>QDPR</i>	612676	<i>SHANK3</i>	606230	<i>TGFBR2</i>	190182		
<i>MTRR</i>	602568	<i>PCBD1</i>	126090	<i>RAB23</i>	606144	<i>SHH</i>	600725	<i>TGIF1</i>	602630		
<i>MUT</i>	609058	<i>PCCA</i>	232000	<i>RAB7A</i>	602298	<i>SHOX</i>	312865	<i>TH</i>	191290		
<i>MUTYH</i>	604933	<i>PCCB</i>	232050	<i>RAD50</i>	604040	<i>SIX3</i>	603714	<i>TMC1</i>	606706		
<i>MYC</i>	190080	<i>PCDH15</i>	605514	<i>RAD51</i>	179617	<i>SLC17A6</i>	607563	<i>TMIE</i>	607237		
<i>MYO6</i>	600970	<i>PDGFRA</i>	173490	<i>RAD51C</i>	602774	<i>SLC19A3</i>	606152	<i>TMPRSS15</i>	606635		
<i>MYO7A</i>	276903	<i>PDHA1</i>	300502	<i>RAD51D</i>	602954	<i>SLC22A5</i>	603377	<i>TMPRSS3</i>	605511		
<i>MYOT</i>	604103	<i>PDHX</i>	608769	<i>RAG1</i>	179615	<i>SLC25A13</i>	603859	<i>TNFRSF11A</i>	603499		

## Anexo III: Lista de 485 genes do painel NGS ‘P3’

Gene (HGNC)	Número MIM										
AARS	601065	BCKDHB	248611	COL2A1	120140	DUOX2	606759	FKRP	606596	HADHB	143450
ABCD1	300371	BIN1	601248	COL3A1	120180	DYM	607461	FKTN	607440	HBB	141900
ACADM	607008	BMP4	112262	COL5A1	120215	DYNC2H1	603297	FLNA	300017	HERC2	605837
ACADVL	609575	BMPRIA	601299	COL5A2	120190	DYRK1A	600855	FLNB	603381	HES7	608059
ACAT1	607809	BRAF	164757	COL6A1	120220	DYSF	603009	FLNC	102565	HLCS	609018
ACP5	171640	BRCA1	113705	COL6A2	120240	EDN1	131240	FMR1	309550	HMGCL	613898
ACTA1	102610	BRCA2	600185	COL6A3	120250	EFNB1	300035	FOLR1	136430	HNRNPDL	607137
ACTB	102630	BRIP1	605882	COL9A1	120210	EGR2	129010	FOXE1	602617	HRAS	190020
ACTG1	102560	BTBD	609019	COL9A2	120260	EIF2AK3	604032	FOXG1	164874	HSPB1	602195
ADA	608958	CACNA1S	114208	COL9A3	120270	EIF4A3	608546	FOXP2	605317	HSPB8	608014
ADAMTS18	607512	CANT1	613165	COMP	600310	ELN	130160	FTCD	606806	IDUA	252800
ADAMTS2	612277	CAPN3	114240	COQ2	609825	EMD	300384	FUS	137070	IFT80	611177
ADCK3	-	CAV3	601253	COQ9	612837	EPCAM	185535	FXN	606829	IL1IRA	600939
AFG3L2	604581	CBS	613381	CP	117700	EPHA3	179611	GADD45G	604949	IL2RG	308380
ALDH3A2	609523	CD3D	186790	CPS1	608307	ERF	611888	GALNS	612222	IL7R	146661
ALDH7A1	107323	CD3E	186830	CREBBP	600140	ERG	165080	GALNT1	602273	IRF6	607199
ALPL	171760	CDH1	192090	CRISPLD2	612434	ETHE1	608451	GALNT12	610290	ITGA7	600536
ALX1	601527	CDH2	114020	CRTAP	605497	EVC	604831	GALT	606999	IVD	607036
ALX3	606014	CDH23	605516	CRYAA	123580	EVC2	607261	GAMT	601240	JAG1	601920
ALX4	605420	CDH7	605806	CRYAB	123590	EXT1	608177	GARS	600287	JAK3	600173
AMN	605799	CDH8	603008	CTDP1	604927	FAF1	604460	GATM	602360	JAM2	606870
ANO5	608662	CDK4	123829	CTNNB1	116806	FAH	613871	GCDH	608801	KATNAL2	614697
APC	611731	CDKL5	300203	CTSK	601105	FANCA	607139	GCH1	600225	KBTBD13	613727
APTX	606350	CDKN2A	600160	CUBN	602997	FANCC	613899	GDAP1	606598	KCNE1	176261
ARG1	608313	CFL1	601442	CUL7	609577	FANCD2	613984	GDF5	601146	KIF22	603213
ARHGAP29	610496	CFTR	602421	CYP21A2	613815	FANCE	613976	GDF6	601147	KIF5A	602821
ARX	300382	CHEK2	604373	CYP27A1	606530	FANCF	613897	GIF	609342	KRAS	190070
ASL	608310	CHST14	608429	CYP7B1	603711	FANCG	602956	GJA1	121014	L1CAM	308840
ASPA	608034	CHST3	603799	DAG1	128239	FBLN5	604580	GJB1	304040	LAMA2	156225
ASS1	603470	CLCN1	118425	DBT	248610	FBN1	134797	GJB2	121011	LAMP2	309060
ATL1	606439	CLDN14	605608	DCLRE1C	605988	FECH	612386	GJB3	603324	LARGE1	603590
ATM	607585	CLPTM1L	612585	DDR2	191311	FGD4	611104	GJB6	604418	LEMD3	607844
ATP7A	300011	CLRN1	606397	DES	125660	FGF8	600483	GLB1	611458	LFNG	602576
ATP7B	606882	CNTNAP2	604569	DHCR24	606418	FGFR1	136350	GLI2	165230	LIFR	151443
ATR	601215	COL10A1	120110	DHCR7	602858	FGFR2	176943	GLI3	165240	LIP1	609252
AXIN2	604025	COL11A1	120280	DLAT	608770	FGFR3	134934	GNAI3	139370	LITAF	603795
B4GALT6	604017	COL11A2	120290	DLL3	602768	FHL1	300163	GNAS	139320	LMAN1	601567
BAP1	603089	COL18A1	120328	DMD	300377	FIG4	609390	GRHL3	608317	LMBRD1	612625
BARD1	601593	COL1A1	120150	DNAJB6	611332	FKBP10	607063	GRIK1	138245	LMNA	150330
BCKDHA	608348	COL1A2	120160	DNM2	602378	FKBP14	614505	HADHA	600890	LRP5	603506

## Anexo III: Lista de 485 genes do painel NGS 'P3', continuação

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
<i>LRSAM1</i>	610933	<i>MTMR2</i>	603557	<i>PAX8</i>	167415	<i>QDPR</i>	612676	<i>SHANK3</i>	606230	<i>TGFBR1</i>	190181
<i>LZTR1</i>	600574	<i>MTR</i>	156570	<i>PCBD1</i>	126090	<i>RAB23</i>	606144	<i>SHH</i>	600725	<i>TGFBR2</i>	190182
<i>MAP2K1</i>	176872	<i>MTRR</i>	602568	<i>PCCA</i>	232000	<i>RAB7A</i>	602298	<i>SHOC2</i>	602775	<i>TGIF1</i>	602630
<i>MATN3</i>	602109	<i>MUT</i>	609058	<i>PCCB</i>	232050	<i>RABEP2</i>	611869	<i>SHOX</i>	312865	<i>TH</i>	191290
<i>MBD2</i>	603547	<i>MUTYH</i>	604933	<i>PCDH15</i>	605514	<i>RAD50</i>	604040	<i>SIX3</i>	603714	<i>TMC1</i>	606706
<i>MBD5</i>	611472	<i>MYC</i>	190080	<i>PDGFRA</i>	173490	<i>RAD51</i>	179617	<i>SLC17A6</i>	607563	<i>TMIE</i>	607237
<i>MC2R</i>	607397	<i>MYO6</i>	600970	<i>PDHA1</i>	300502	<i>RAD51C</i>	602774	<i>SLC19A3</i>	606152	<i>TMPRSS15</i>	606635
<i>MCCC1</i>	609010	<i>MYO7A</i>	276903	<i>PDHX</i>	608769	<i>RAD51D</i>	602954	<i>SLC22A5</i>	603377	<i>TMPRSS3</i>	605511
<i>MCCC2</i>	609014	<i>MYOT</i>	604103	<i>PDSS1</i>	607429	<i>RAF1</i>	164760	<i>SLC25A13</i>	603859	<i>TNFRSF11A</i>	603499
<i>MECP2</i>	300005	<i>NAGS</i>	608300	<i>PDSS2</i>	610564	<i>RAG1</i>	179615	<i>SLC25A15</i>	603861	<i>TP53</i>	191170
<i>MED25</i>	610197	<i>NBN</i>	602667	<i>PFKL</i>	171860	<i>RAG2</i>	179616	<i>SLC26A2</i>	606718	<i>TP63</i>	603273
<i>MEGF10</i>	612453	<i>NDN</i>	602117	<i>PHF8</i>	300560	<i>RAI1</i>	607642	<i>SLC26A4</i>	605646	<i>TPM2</i>	190990
<i>MEN1</i>	613733	<i>NDRG1</i>	605262	<i>PHGDH</i>	606879	<i>RARA</i>	180240	<i>SLC2A1</i>	138140	<i>TPM3</i>	191030
<i>MESP2</i>	605195	<i>NDUFV2</i>	600532	<i>PLCB4</i>	600810	<i>RBBP8</i>	604124	<i>SLC5A5</i>	601843	<i>TPO</i>	606765
<i>MFN2</i>	608507	<i>NECTIN1</i>	600644	<i>PLEC</i>	601282	<i>RECQL4</i>	603780	<i>SMAD4</i>	600993	<i>TRAPPC2</i>	300202
<i>MID1</i>	300552	<i>NEFL</i>	162280	<i>PLOD1</i>	153454	<i>REEP1</i>	609139	<i>SMARCAL1</i>	606622	<i>TRIM32</i>	602290
<i>MIR1206</i>	.	<i>NF1</i>	613113	<i>PMP22</i>	601097	<i>RET</i>	164761	<i>SNAP29</i>	604202	<i>TRIP11</i>	604505
<i>MIR1207</i>	.	<i>NIPA1</i>	608145	<i>PMS2</i>	600259	<i>RGMA</i>	607362	<i>SNRPN</i>	182279	<i>TRPC6</i>	603652
<i>MIR1208</i>	.	<i>NIPBL</i>	608667	<i>POGZ</i>	614787	<i>RIT1</i>	609591	<i>SOD1</i>	147450	<i>TRPS1</i>	604386
<i>MIR140</i>	611894	<i>NKX3-2</i>	602183	<i>POLR1C</i>	610060	<i>RMRP</i>	157660	<i>SOS1</i>	182530	<i>TRPV4</i>	605427
<i>MIR200B</i>	612091	<i>NOG</i>	602991	<i>POLR1D</i>	613715	<i>ROR2</i>	602337	<i>SOS2</i>	601247	<i>TSC1</i>	605284
<i>MLH1</i>	120436	<i>NOL8</i>	611534	<i>POMGNT1</i>	606822	<i>RPS27L</i>	612055	<i>SOST</i>	605740	<i>TSC2</i>	191092
<i>MMAA</i>	607481	<i>NOTCH3</i>	600276	<i>POMT1</i>	607423	<i>RTTN</i>	610436	<i>SOX9</i>	608160	<i>TSHB</i>	188540
<i>MMAB</i>	607568	<i>NPC1</i>	607623	<i>POMT2</i>	607439	<i>RUNX1</i>	151385	<i>SP7</i>	606633	<i>TSHR</i>	603372
<i>MMACHC</i>	609831	<i>NPC2</i>	601015	<i>POR</i>	124015	<i>RUNX2</i>	600211	<i>SPAST</i>	604277	<i>TSHZ1</i>	614427
<i>MMADHC</i>	611935	<i>NPR2</i>	108961	<i>POTED</i>	607549	<i>RYR1</i>	180901	<i>SPG11</i>	610844	<i>TSPEAR</i>	612920
<i>MMP13</i>	600108	<i>NRAS</i>	164790	<i>PPIB</i>	123841	<i>SALL1</i>	602218	<i>SPG7</i>	602783	<i>TWIST1</i>	601622
<i>MMP9</i>	120361	<i>NSD1</i>	606681	<i>PQBP1</i>	300463	<i>SATB2</i>	608148	<i>SPR</i>	182125	<i>UBE3A</i>	601623
<i>MOCS1</i>	603707	<i>NT5C3A</i>	606224	<i>PRKARIA</i>	188830	<i>SBDS</i>	607444	<i>SRY</i>	480000	<i>USH1C</i>	605242
<i>MOCS2</i>	603708	<i>NTNG1</i>	608818	<i>PRPS1</i>	311850	<i>SBF2</i>	607697	<i>STK11</i>	602216	<i>USH1G</i>	607696
<i>MPZ</i>	159440	<i>OFD1</i>	300170	<i>PRSS1</i>	276000	<i>SCN4A</i>	603967	<i>SUMO1</i>	601912	<i>USH2A</i>	608400
<i>MRAP</i>	609196	<i>OGN</i>	602383	<i>PRX</i>	605725	<i>SCO2</i>	604272	<i>TARDBP</i>	605078	<i>USHBP1</i>	611810
<i>MRE11</i>	600814	<i>OTC</i>	300461	<i>PSAT1</i>	610936	<i>SELENON</i>	606210	<i>TBX1</i>	602054	<i>USP25</i>	.
<i>MSH2</i>	609309	<i>OTOF</i>	603681	<i>PSPH</i>	172480	<i>SERPINH1</i>	600943	<i>TBX22</i>	300307	<i>VAPB</i>	605704
<i>MSH3</i>	600887	<i>OXCT1</i>	601424	<i>PTCH1</i>	601309	<i>SETBP1</i>	611060	<i>TCAP</i>	604488	<i>VHL</i>	608537
<i>MSH6</i>	600678	<i>P3H1</i>	610339	<i>PTEN</i>	601728	<i>SETX</i>	608465	<i>TCF12</i>	600480	<i>WHRN</i>	607928
<i>MSTN</i>	601788	<i>PABPN1</i>	602279	<i>PTH1R</i>	168468	<i>SGCA</i>	600119	<i>TCF4</i>	602272	<i>WNT3</i>	165330
<i>MSX1</i>	142983	<i>PAFAH1B1</i>	601545	<i>PTPN11</i>	176876	<i>SGCB</i>	600900	<i>TCOF1</i>	606847	<i>XRCC3</i>	600675
<i>MSX2</i>	123101	<i>PAH</i>	612349	<i>PTS</i>	612719	<i>SGCD</i>	601411	<i>TERT</i>	187270	<i>ZAP70</i>	176947
<i>MTHFR</i>	607093	<i>PALB2</i>	610355	<i>PVT1</i>	165140	<i>SGCG</i>	608896	<i>TFAP2A</i>	107580	<i>ZIC2</i>	603073
<i>MTM1</i>	300415	<i>PAPSS2</i>	603005	<i>PYGM</i>	608455	<i>SH3BP2</i>	602104	<i>TG</i>	188450		

## Anexo IV: Lista de 496 genes do painel NGS ‘P4’

Gene (HGNC)	Número MIM										
AARS	601065	BINI	601248	COL1A2	120160	DNM2	602378	FKRP	606596	HBB	141900
ABCD1	300371	BMP1	112264	COL2A1	120140	DUOX2	606759	FKTN	607440	HES7	608059
ACADM	607008	BMP4	112262	COL3A1	120180	DYM	607461	FLNA	300017	HLCS	609018
ACADVL	609575	BMPRIA	601299	COL5A1	120215	DYNC2H1	603297	FLNB	603381	HMGCL	613898
ACAT1	607809	BRAF	164757	COL5A2	120190	DYRK1A	600855	FLNC	102565	HNRNPDL	607137
ACP5	171640	BRCA1	113705	COL6A1	120220	DYSF	603009	FMR1	309550	HRAS	190020
ACTA1	102610	BRCA2	600185	COL6A2	120240	EDN1	131240	FOLR1	136430	HSPB1	602195
ACTB	102630	BRIP1	605882	COL6A3	120250	EFNB1	300035	FOXE1	602617	HSPB8	608014
ACTG1	102560	BTBD	609019	COL9A1	120210	EGR2	129010	FOXG1	164874	IDUA	252800
ADA	608958	CACNA1S	114208	COL9A2	120260	EIF2AK3	604032	FOXP2	605317	IFITM5	614757
ADAMTS18	607512	CANT1	613165	COL9A3	120270	EIF4A3	608546	FTCD	606806	IFT80	611177
ADAMTSL2	612277	CAPN3	114240	COMP	600310	ELN	130160	FUS	137070	IL11RA	600939
ADCK3	.	CAV3	601253	COQ2	609825	EMD	300384	FXN	606829	IL2RG	308380
AFG3L2	604581	CBL	165360	COQ9	612837	EPCAM	185535	GADD45G	604949	IL7R	146661
ALDH3A2	609523	CBS	613381	CP	117700	EPHA3	179611	GALNS	612222	IRF6	607199
ALDH7A1	107323	CD3D	186790	CPS1	608307	ERF	611888	GALNT1	602273	ITGA7	600536
ALPL	171760	CD3E	186830	CREB3L1	616215	ERG	165080	GALNT12	610290	IVD	607036
ALX1	601527	CDC45	603465	CREBBP	600140	ETHE1	608451	GALT	606999	JAG1	601920
ALX3	606014	CDH1	192090	CRISPLD2	612434	EVC	604831	GAMT	601240	JAK3	600173
ALX4	605420	CDH2	114020	CRTAP	605497	EVC2	607261	GARS	600287	JAM2	606870
AMN	605799	CDH23	605516	CRYAA	123580	EXT1	608177	GATM	602360	JMJD1C	604503
ANO5	608662	CDH7	605806	CRYAB	123590	FAF1	604460	GCDH	608801	KBTBD13	613727
APC	611731	CDH8	603008	CTDPI	604927	FAH	613871	GCHI	600225	KCNE1	176261
APTX	606350	CDK4	123829	CTNNB1	116806	FANCA	607139	GDAPI	606598	KIF22	603213
ARG1	608313	CDKL5	300203	CTSK	601105	FANCC	613899	GDF5	601146	KIF5A	602821
ARHGAP29	610496	CDKN2A	600160	CUBN	602997	FANCD2	613984	GDF6	601147	KRAS	190070
ARX	300382	CFL1	601442	CUL7	609577	FANCE	613976	GIF	609342	L1CAM	308840
ASL	608310	CFTR	602421	CYP21A2	613815	FANCF	613897	GJA1	121014	LAMA2	156225
ASPA	608034	CHD8	610528	CYP27A1	606530	FANCG	602956	GJB1	304040	LAMP2	309060
ASS1	603470	CHEK2	604373	CYP7B1	603711	FBLN5	604580	GJB2	121011	LARGE1	603590
ATL1	606439	CHST14	608429	DAG1	128239	FBN1	134797	GJB3	603324	LEMD3	607844
ATM	607585	CHST3	603799	DBT	248610	FECH	612386	GJB6	604418	LFNG	602576
ATP7A	300011	CLCN1	118425	DCLRE1C	605988	FGD4	611104	GLB1	611458	LIFR	151443
ATP7B	606882	CLDN14	605608	DDR2	191311	FGF8	600483	GLI2	165230	LIPI	609252
ATR	601215	CLPTMIL	612585	DES	125660	FGFR1	136350	GLI3	165240	LITAF	603795
AXIN2	604025	CLRN1	606397	DHCR24	606418	FGFR2	176943	GNAI3	139370	LMAN1	601567
B4GALT6	604017	COL10A1	120110	DHCR7	602858	FGFR3	134934	GNAS	139320	LMBRD1	612625
BAP1	603089	COL11A1	120280	DLAT	608770	FHL1	300163	GRHL3	608317	LMNA	150330
BARD1	601593	COL11A2	120290	DLL3	602768	FIG4	609390	GRIK1	138245	LRP5	603506
BCKDHA	608348	COL18A1	120328	DMD	300377	FKBP10	607063	HADHA	600890	LRSAM1	610933
BCKDHB	248611	COL1A1	120150	DNAJB6	611332	FKBP14	614505	HADHB	143450	LZTR1	600574

Anexo IV: Lista de 496 genes do painel NGS 'P4', continuação

Gene (HGNC)	Número MIM										
MAP2K1	176872	MTRR	602568	PCCA	232000	RABEP2	611869	SIX3	603714		
MAP2K2	601263	MUT	609058	PCCB	232050	RAD50	604040	SLC19A3	606152	TH	191290
MATN3	602109	MUTYH	604933	PCDH15	605514	RAD51	179617	SLC22A5	603377	TMC1	606706
MBD2	603547	MYC	190080	PDGFRA	173490	RAD51C	602774	SLC25A13	603859	TMEM38B	611236
MBD5	611472	MYO6	600970	PDHA1	300502	RAD51D	602954	SLC25A15	603861	TMIE	607237
MC2R	607397	MYO7A	276903	PDHX	608769	RAF1	164760	SLC26A2	606718	TMPRSS15	606635
MCCC1	609010	MYOT	604103	PDSSI	607429	RAG1	179615	SLC26A4	605646	TMPRSS3	605511
MCCC2	609014	NAGS	608300	PDSS2	610564	RAG2	179616	SLC2A1	138140	TNFRSF11A	603499
MECP2	300005	NBN	602667	PFKL	171860	RAI1	607642	SLC5A5	601843	TP53	191170
MED25	610197	NDN	602117	PHF8	300560	RARA	180240	SMAD4	600993	TP63	603273
MEGF10	612453	NDRG1	605262	PHGDH	606879	RBBP8	604124	SMARCAL1	606622	TPM2	190990
MEN1	613733	NDUFV2	600532	PLCB4	600810	RECQL4	603780	SNAP29	604202	TPM3	191030
MESP2	605195	NECTIN1	600644	PLEC	601282	REEP1	609139	SNRPN	182279	TPO	606765
MFN2	608507	NEFL	162280	PLOD1	153454	RET	164761	SOD1	147450	TRAPPC2	300202
MID1	300552	NF1	613113	PLOD2	601865	RIT1	609591	SOS1	182530	TRIM32	602290
MIR1206	.	NF2	607379	PLS3	300131	RMRP	157660	SOS2	601247	TRIP11	604505
MIR1207	.	NIPA1	608145	PMP22	601097	ROR2	602337	SOST	605740	TRPC6	603652
MIR1208	.	NIPBL	608667	PMS2	600259	RPS27L	612055	SOX9	608160	TRPS1	604386
MIR140	611894	NKX3-2	602183	POLRIC	610060	RTTN	610436	SP7	606633	TRPV4	605427
MIR200B	612091	NOG	602991	POLRID	613715	RUNX1	151385	SPARC	182120	TSC1	605284
MLH1	120436	NOL8	611534	POMGNT1	606822	RUNX2	600211	SPAST	604277	TSC2	191092
MMAA	607481	NOTCH3	600276	POMT1	607423	RYR1	180901	SPG11	610844	TSHB	188540
MMAB	607568	NPC1	607623	POMT2	607439	SALL1	602218	SPG7	602783	TSHR	603372
MMACHC	609831	NPC2	601015	POR	124015	SATB2	608148	SPR	182125	TSHZ1	614427
MMADHC	611935	NPR2	108961	PPIB	123841	SBDS	607444	SPRED1	609291	TSPEAR	612920
MMP13	600108	NRAS	164790	PQBPI	300463	SBF2	607697	SRY	480000	TWIST1	601622
MMP9	120361	NSD1	606681	PRKARIA	188830	SCN4A	603967	STK11	602216	UBE3A	601623
MOCS1	603707	NT5C3A	606224	PRPS1	311850	SCO2	604272	SUMO1	601912	USH1C	605242
MOCS2	603708	NTNG1	608818	PRSS1	276000	SELENON	606210	TARDBP	605078	USH1G	607696
MPZ	159440	OFD1	300170	PRX	605725	SERPINF1	172860	TBX1	602054	USH2A	608400
MRAP	609196	OGN	602383	PSAT1	610936	SERPINH1	600943	TBX22	300307	USHBP1	611810
MRE11A	.	OTC	300461	PSPH	172480	SETBP1	611060	TBX6	602427	USP25	.
MSH2	609309	OTOF	603681	PTCH1	601309	SETX	608465	TCAP	604488	VAPB	605704
MSH3	600887	OXCT1	601424	PTEN	601728	SGCA	600119	TCF12	600480	VHL	608537
MSH6	600678	P3H1	610339	PTH1R	168468	SGCB	600900	TCF4	602272	WHRN	607928
MSTN	601788	PABPN1	602279	PTPN11	176876	SGCD	601411	TCOF1	606847	WNT1	164820
MSX1	142983	PAFAH1B1	601545	PTS	612719	SGCG	608896	TERT	187270	WNT3	165330
MSX2	123101	PAH	612349	PVT1	165140	SH3BP2	602104	TFAP2A	107580	XRCC3	600675
MTHFR	607093	PALB2	610355	PYGM	608455	SHANK3	606230	TG	188450	ZAP70	176947
MTM1	300415	PAPSS2	603005	QDPR	612676	SHH	600725	TGFBRI	190181	ZIC1	600470
MTMR2	603557	PAX8	167415	RAB23	606144	SHOC2	602775	TGFBRI2	190182	ZIC2	603073
MTR	156570	PCBD1	126090	RAB7A	602298	SHOX	312865	TGIF1	602630		

Anexo V: Genes da via de sinalização Wnt

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
APC	* 611731	DVL2	* 602151	NKD2	* 607852	RYK	* 600524	WNT4	* 603490
APC2	* 612034	DVL3	* 601368	NLK	* 609476	SENP2	* 608261	WNT5A	* 164975
AXIN1	* 603816	EP300	* 602700	NOTUM	* 609847	SERPINF1	* 172860	WNT5B	* 606361
AXIN2	* 604025	FBXW11	* 605651	PLCB1	* 607120	SFRP1	* 604156	WNT6	* 604663
BAMBI	* 604444	FOSL1	* 136515	PLCB2	* 604114	SFRP2	* 604157	WNT7A	* 601570
BTRC	* 603482	FRAT1	* 602503	PLCB3	* 600230	SFRP4	* 606570	WNT7B	* 601967
CACYBP	* 606186	FRAT2	* 605006	PLCB4	* 600810	SFRP5	* 604158	WNT8A	* 606360
CAMK2A	* 114078	FRZB	* 605083	PORCN	* 300651	SIAH1	* 602212	WNT8B	* 601396
CAMK2B	* 607707	FZD1	* 603408	PPARD	* 600409	SKP1	* 601434	WNT9A	* 602863
CAMK2D	* 607708	FZD10	* 606147	PPP3CA	* 114105	SMAD3	* 603109	WNT9B	* 602864
CAMK2G	* 602123	FZD2	* 600667	PPP3CB	* 114106	SMAD4	* 600993	ZNRF3	* 612062
CBY1	* 607757	FZD3	* 606143	PPP3CC	* 114107	SOST	* 605740		
CCN4	* 603398	FZD4	* 604579	PPP3R1	* 601302	SOX17	* 610928		
CCND1	* 168461	FZD5	* 601723	PPP3R2	* 613821	TBLIX	* 300196		
CCND2	* 123833	FZD6	* 603409	PRICKLE1	* 608500	TBLIXR1	* 608628		
CCND3	* 123834	FZD7	* 603410	PRICKLE2	* 608501	TBLIY	* 400033		
CER1	* 603777	FZD8	* 606146	PRICKLE3	* 300111	TCF7	* 189908		
CHD8	* 610528	FZD9	* 601766	PRICKLE4	* 611389	TCF7L1	* 604652		
CREBBP	* 600140	GPC4	* 300168	PRKACA	* 601639	TCF7L2	* 602228		
CSNK1A1	* 600505	GSK3B	* 605004	PRKACB	* 176892	TLE1	* 600189		
CSNK1A1L	-	INVS	* 243305	PRKACG	* 176893	TLE2	* 601041		
CSNK1E	* 600863	JUN	* 165160	PRKCA	* 176960	TLE3	* 600190		
CSNK2A1	* 115440	LEF1	+ 153245	PRKCB	* 176970	TLE4	* 605132		
CSNK2A2	* 115442	LGR4	* 606666	PRKCG	* 176980	TLE6	* 612399		
CSNK2A3	-	LGR5	* 606667	PSEN1	* 104311	TLE7	-		
CSNK2B	* 115441	LGR6	* 606653	RAC1	* 602048	TP53	* 191170		
CTBP1	* 602618	LRP5	* 603506	RAC2	* 602049	TPTEP2-CSNK1E	-		
CTBP2	* 602619	LRP6	* 603507	RAC3	* 602050	VANGL1	* 610132		
CTNNB1	* 116806	MAP3K7	* 602614	RBX1	* 603814	VANGL2	* 600533		
CTNNBIP1	* 607758	MAPK10	* 602897	RHOA	* 165390	WIF1	* 605186		
CTNND2	* 604275	MAPK8	* 601158	RNF43	* 612482	WNT1	* 164820		
CUL1	* 603134	MAPK9	* 602896	ROCK2	* 604002	WNT1 0A	* 606268		
CXXC4	* 611645	MMP7	* 178990	ROR1	* 602336	WNT1 0B	* 601906		
DAAM1	* 606626	MYC	* 190080	ROR2	* 602337	WNT1 1	* 603699		
DAAM2	* 606627	NFATC1	* 600489	RSPO1	* 609595	WNT1 6	* 606267		
DKK1	* 605189	NFATC2	* 600490	RSPO2	* 610575	WNT2	* 147870		
DKK2	* 605415	NFATC3	* 602698	RSPO3	* 610574	WNT2B	* 601968		
DKK4	* 605417	NFATC4	* 602699	RSPO4	* 610573	WNT3	* 165330		
DVL1	* 601365	NKD1	* 607851	RUVBL1	* 603449	WNT3A	* 606359		

Anexo VI: Genes da via de sinalização RANKL

Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM	Gene (HGNC)	Número MIM
<i>ABL1</i>	* 189980	<i>MAPK14</i>	* 600289	<i>TNFSF11</i>	* 602642
<i>AKT1</i>	* 164730	<i>MAPK3</i>	* 601795	<i>TRAF1</i>	* 601711
<i>AKT2</i>	* 164731	<i>MAPK8</i>	* 601158	<i>TRAF2</i>	* 601895
<i>ATF2</i>	* 123811	<i>MAPK9</i>	* 602896	<i>TRAF3</i>	* 601896
<i>ATP6V1E1</i>	* 108746	<i>MITF</i>	* 156845	<i>TRAF5</i>	* 602356
<i>BAD</i>	* 603167	<i>MTOR</i>	* 601231	<i>TRAF6</i>	* 602355
<i>CAPN1</i>	* 114220	<i>NFATC1</i>	* 600489	<i>TREM2</i>	* 605086
<i>CBL</i>	* 165360	<i>NFKB1</i>	* 164011	<i>TYROBP</i>	* 604142
<i>CBLB</i>	* 604491	<i>NFKB2</i>	* 164012	<i>VAV3</i>	* 605541
<i>CDC42</i>	* 116952	<i>NFKBIA</i>	* 164008		
<i>CEBPB</i>	* 189965	<i>OSCAR</i>	* 606862		
<i>CHUK</i>	* 600664	<i>PIK3R1</i>	* 171833		
<i>CREB1</i>	* 123810	<i>PIK3R2</i>	* 603157		
<i>CYLD</i>	* 605018	<i>PILRA</i>	* 605341		
<i>EGFR</i>	* 131550	<i>PLCG1</i>	* 172420		
<i>EIF4EBP1</i>	* 602223	<i>PLCG2</i>	* 600220		
<i>ETV5</i>	* 601600	<i>PRKAA1</i>	* 602739		
<i>FCAR</i>	* 147045	<i>PRKAA2</i>	* 600497		
<i>FCGR3A</i>	* 146740	<i>PSMD14</i>	* 607173		
<i>FCGR3B</i>	* 610665	<i>PTK2</i>	* 600758		
<i>FHL2</i>	* 602633	<i>PTPN6</i>	* 176883		
<i>FOS</i>	* 164810	<i>RAC1</i>	* 602048		
<i>FOXO4</i>	* 300033	<i>RELA</i>	* 164014		
<i>FYN</i>	* 137025	<i>RELB</i>	* 604758		
<i>GAB2</i>	* 606203	<i>RHOA</i>	* 165390		
<i>HSP90AA1</i>	* 140571	<i>RPS6KB1</i>	* 608938		
<i>HSPA5</i>	* 138120	<i>RPS6KB2</i>	* 608939		
<i>HSPA8</i>	* 600816	<i>RUNX1</i>	* 151385		
<i>IKBKB</i>	* 603258	<i>SIRPB1</i>	* 603889		
<i>IKBKG</i>	* 300248	<i>SMARCA4</i>	* 603254		
<i>JAK1</i>	* 147795	<i>SPI1</i>	* 165170		
<i>JUN</i>	* 165160	<i>SQSTM1</i>	* 601530		
<i>LYN</i>	* 165120	<i>SRC</i>	* 190090		
<i>MAP2K1</i>	* 176872	<i>STAT1</i>	* 600555		
<i>MAP2K6</i>	* 601254	<i>SYK</i>	* 600085		
<i>MAP2K7</i>	* 603014	<i>TAB1</i>	* 602615		
<i>MAP3K7</i>	* 602614	<i>TAB2</i>	* 605101		
<i>MAP3K8</i>	* 191195	<i>TNFRSF11A</i>	* 603499		
<i>MAPK1</i>	* 176948	<i>TNFRSF11B</i>	* 602643		