

PAULO MARCIO YAMAGUTI

**MANIFESTAÇÕES BUCAIS DE PACIENTES COM DOENÇAS
RENAIS HEREDITÁRIAS E NEFROCALCINOSE E ANÁLISE DE
VARIAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE PACIENTES COM
AMELOGÊNESE IMPERFEITA E FHHNC**

BRASÍLIA

2012

PAULO MARCIO YAMAGUTI

**MANIFESTAÇÕES BUCAIS DE PACIENTES COM DOENÇAS
RENAIS HEREDITÁRIAS E NEFROCALCINOSE E ANÁLISE DE
VARIAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE PACIENTES COM
AMELOGÊNESE IMPERFEITA E FHHNC**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília como requisito para obtenção
do grau de Doutor em Ciências da Saúde
– Área de concentração: Saúde Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina
Acevedo

BRASÍLIA

2012

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos pacientes e seus familiares que concordaram em participar voluntariamente dessa pesquisa.

Que esse trabalho contribua para melhor compreensão de vossa doença e que possa trazer algum dia, um benefício direto a vocês que, com tanta compreensão, colaboraram espontaneamente com nosso projeto.

AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES DESSE TRABALHO

À professora Dra. Ana Carolina Acevedo-Poppe, minha orientadora, conselheira e amiga para a vida inteira. Exemplo de professora, pesquisadora e orientadora. Minha inspiração profissional e pessoal como exemplo de coragem, dedicação e batalha. Minha admiração pelo impecável rigor científico e primor nos trabalhos.

À professora Dra. Lilian Marly de Paula pela confiança, pelo apoio na carreira profissional, pelos conselhos pessoais, pela amizade e carinho. Minha eterna gratidão e admiração à sua coerência, luta pelo bem coletivo, pela defesa da educação de qualidade e da saúde bucal coletiva.

Ao professor Dr. Francisco de Assis Rocha Neves pelas sugestões e contribuições ao trabalho e pelo apoio institucional à realização da pesquisa. Pelo exemplo de dedicação, compromisso e objetividade. Pela recepção em seu Laboratório, por abraçar o nosso projeto, pela confiança depositada e pela amizade.

À Dra. Viviane Brandão pela disponibilidade, pela paciência, pelas sugestões e por ter reexaminado todos os pacientes encaminhados.

Ao professor Dr. Gustavo Barcelos Barra, ao professor Dr. Takafumi Noma e à professora Dra. Keiko Miyoshi por terem me ensinado os primeiros passos dos experimentos realizados.

À JICA pela bolsa de estudos concedida para estágio no Japão.

À professora Dra. Heliana Dantas Mestrinho, pelo apoio da Divisão de Odontologia do Hospital Universitário da UnB e pelo acolhimento, conselhos e amizade.

À Dra. Maria do Carmo Sorci Dias Scher, à Dra. Maristela Estevão Barbosa, ao Dr. Luís Cláudio Gonçalves de Castro e à Dra. Kélia Regina Xavier pelo encaminhamento dos pacientes e pelas contribuições.

Ao Laboratório SABIN.

À professora Dra. Adriana Lofrano, à professora Dra. Marie Togashi e ao professor Dr. Fábio Pitella pelas contribuições ao longo dos experimentos.

Aos professores Luís Simeoni e Ricardo Pratesi responsáveis pelos laboratórios de Farmacologia Molecular e Pediatria onde foi realizada parte dos experimentos.

Ao técnico de laboratório Alexandre Cesar Palermo pela ajuda com os experimentos e companhia.

Aos técnicos de laboratório Maria da Glória, Lucas e Rilva.

Aos alunos e ex-alunos de PIBIC Bruno Sakamoto, Guido Ferreira, Rodrigo Gomes, Rafaela Peixoto e Rayssa Bendor pela colaboração.

Aos meus pais e familiares pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus sócios e amigos Haroldo Habe, Gustavo Adolfo Rivera e An Tien Li, pelo companheirismo, compreensão, ombro amigo e troca de experiências diárias.

Aos amigos sempre presentes e incentivadores da caminhada acadêmica: Raquel Ribeiro Gomes, Nilce dos Santos Melo, André Ferreira Leite, Paulo Tadeu Figueiredo, Eliete Neves da Silva Guerra, Leandro Augusto Hilgert, Patrícia Nóbrega Pereira, Fernanda Cristina Pimentel Garcia, Júlio César Franco Almeida e Jesuânia Maria Guardiero Pfeiffer. Tenham a certeza de que vocês são minha inspiração e motivação para seguir nessa trilha.

"É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia."

Autora: Clarice Lispector

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi relatar as manifestações bucais de pacientes com doenças renais hereditárias e nefrocalcinose atendidos no serviço de nefrologia de três Hospitais da área metropolitana de Brasília, e realizar análise de mutação abordando genes candidatos em três pacientes que apresentaram fenótipo de amelogênese imperfeita (AI). Um total de seis pacientes com hipomagnesemia e hipercalemiúria familiar com nefrocalcinose (FHHNC), um paciente com acidose tubular renal distal (ATRd), dois pacientes com ATRd e surdez, e uma paciente com osteopetrose foram estudados. Todos os pacientes apresentaram defeitos de desenvolvimento do esmalte variando de leves opacidades difusas a hipoplasias severas. Com exceção da paciente com osteopetrose que apresentou maloclusão e alteração da cronologia de erupção dentária com retenção de dentes decíduos e permanentes, não foram observadas outras manifestações bucais nos pacientes. Em dois dos três pacientes com FHHNC e AI que foram submetidos à análise de variação de sequência, foram observadas três substituições em heterozigose composta nos genes *CLDN16* e *CLDN19*. O paciente com fenótipo de AI hipomaturada e hipoplásica apresentou as substituições F85L na *CLDN16* e G20D e L90R na *CLDN19*. O paciente com AI hipoplásica apresentou as substituições F85L na *CLDN16* e G20D e R200Q na *CLDN19*. Aparentemente, a outra paciente apresentou uma deleção no gene *CLDN16* que precisa ser confirmada por outros métodos. Os resultados sugerem que pacientes com doenças renais hereditárias e nefrocalcinose podem apresentar defeitos de desenvolvimento do esmalte com fenótipo de AI e que pacientes com AI sem etiologia definida podem ser portadores de doenças renais hereditárias. Outros estudos são necessários para comprovar o efeito funcional da associação das substituições de aminoácido encontrada nos pacientes com AI e FHHNC desse estudo.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the oral manifestations of inherited renal diseases patients with nephrocalcinosis followed by three Nephrology Services from three Hospitals located in the metropolitan area of Brasilia. Besides, three patients who exhibited enamel defects resembling amelogenesis imperfecta (AI) were submitted to sequence analysis using candidate genes approach. A total of six patients with hypomagnesemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis (FHHNC), one patient with distal renal tubular acidosis (dRTA), two patients with dRTA and hearing loss, and one patient with osteopetrosis were included in this study. All patients exhibited developmental defects of enamel ranging from slight diffuse opacities to severe hypoplasia. Except for the osteopetrosis patient who also exhibited malocclusion, altered tooth eruption chronology and deciduous and permanent teeth retention, patients did not present any other oral manifestation. Two of the patients with FHHNC and enamel defects resembling AI who were submitted to sequence analysis, presented three compound heterozygous substitutions in the *CLDN16* and *CLDN19* genes. The patient with hypomature and hypoplastic AI phenotype presented a F85L substitution in the *CLDN16* and a G20D and a L90R substitution in the *CLDN19*. The patient with hypoplastic AI presented a F85L substitution in the *CLDN16* and a G20D and a R200Q substitution in the *CLDN19*. One patient exhibited an apparent deletion in the *CLDN16* gene which has to be confirmed using other methods. The results suggest that inherited renal diseases patients with nephrocalcinosis may present developmental defects of enamel resembling AI, and that non-diagnosed AI patients` may present inherited renal disturbances. Other studies are necessary to determine the functional effects of the amino acids substitutions detected in this study in the FHHNC patients with AI.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases da amelogênese.	5
Figura 2 - Ameloblastos na fase de transição para a fase de maturação.....	7
Figura 3 - Resumo dos valores bioquímicos dos exames de sangue e urina e das principais manifestações clínicas dos pacientes com FHHNC	29
Figura 4 - Heredograma da família dos pacientes 1 e 2.....	30
Figura 5 - Manifestações bucais dos pacientes 1 e 2.....	31
Figura 6 - Heredograma da família dos pacientes 3 e 4.....	32
Figura 7 - Manifestações bucais do paciente 3.....	33
Figura 8 - Resumo dos polimorfismos encontrados no gene <i>SLC4A2</i> no paciente.....	34
Figura 9 - Variações de sequência encontradas no gene <i>CLDN16</i> no paciente.....	36
Figura 10 - Resultado da análise da substituição F85L na <i>CLDN16</i> pelo programa POLYPHEN.....	36
Figura 11 - Variações de sequência encontradas no gene <i>CLDN19</i> no paciente 3.....	37
Figura 12 - Resultado da análise da substituição G20D na <i>CLDN19</i> pelo programa POLYPHEN.....	37
Figura 13 - Resultado da análise da substituição L90R na <i>CLDN19</i> pelo programa POLYPHEN.....	38
Figura 14 - Manifestações bucais da paciente 4.....	38
Figura 15 - Ilustração das variações de sequência encontradas na família dos pacientes 3 e 4.....	39
Figura 16 - Heredograma da família do paciente 5.....	40
Figura 17 - Manifestações bucais do paciente 5 e imagem de ultrassonografia.....	41
Figura 18 - Variações de sequência encontradas no gene <i>CLDN16</i> no paciente 3.....	42

Figura 19 – Variações de sequência encontradas no gene <i>CLDN19</i> no paciente 5.....	43
Figura 20 - Resultado da análise da substituição R200Q na <i>CLDN19</i> pelo programa POLYPHEN.....	44
Figura 21 - Ilustração das variações de sequência encontradas na família do paciente 5.....	44
Figura 22: Heredograma da família da paciente 6.....	45
Figura 23 - Manifestações bucais da paciente 6.....	46
Figura 24 – Manifestações bucais do paciente 7.....	48
Figura 25 - Heredograma da família do paciente 8.....	49
Figura 26 - Manifestações bucais do paciente 8.....	50
Figura 27 - Manifestações bucais do paciente 9.....	51
Figura 28 - Manifestações bucais da paciente 10.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – graus centígrados

ACII – gene que codifica a proteína anidrase carbônica II

ACII – proteína anidrase carbônica II

ACIV – gene que codifica a proteína anidrase carbônica IV

ACVI – proteína anidrase carbônica VI

ACVI – gene que codifica a proteína anidrase carbônica VI

ACIV – proteína anidrase carbônica IV

AE2 – proteína anion exchanger 2 – trocador de cloro/bicarbonato

AI – Amelogênese Imperfeita

AMBL – gene que codifica a proteína ameloblastina

AMELX – gene que codifica a proteína amelogenina

ATR – acidose tubular renal

ATRd – acidose tubular renal distal

Ca⁺² - cálcio

CFTR- gene que codifica a proteína receptor transmembrana da fibrose cística

CFTR- proteína receptor transmembrana da fibrose cística

Cl⁻ - cloro

CLDN16 – gene que codifica a proteína de junção oclusiva claudina-16

CLDN16 – proteína de junção oclusiva claudina-16

CLDN19 – gene que codifica a proteína de junção oclusiva claudina-19

CLDN19 – proteína de junção oclusiva claudina-19

CNNM4 – gene que codifica a proteína transportadora de metal *cyclin M-4*

CO₂ - dióxido de carbono

CONEP - Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

DLX3 - gene que codifica a proteína *distal less homeobox 3*

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etileno diaminotetracético

ENAM – gene que codifica a proteína enamelinina

ERS – *Enamel Renal Syndrome*

EXO-SAP – exonuclease-1 + fosfatase alcalina de camarão

F85L – substituição da fenilalanina 85 por leucina

FAM20A – gene que codifica a proteína *Family with sequence similarity 20, member A*

FAMH83 – gene que codifica a proteína *Family with sequence similarity 83, member H*

FHHNC – hipomagnesemia e hipercalcúria familiar com nefrocalcinose

G20D – substituição da glicina 20 por ácido aspártico

H⁺ - prótons de hidrogênio

H⁺ATPases – bomba de prótons de hidrogênio

H₂CO₃ - gás carbônico

H₂O - água

HCO₃⁻ - bicarbonato

HDB - Hospital de Base de Brasília

HMIB - Hospital Materno Infantil de Brasília

HUB – Hospital Universitário de Brasília

KLK-4 – gene que codifica a proteína kalicreína-4

L90P – substituição da leucina 90 por prolina

L90R – substituição da leucina 90 por arginina

Mg⁺² - magnésio

min - minuto

MMP-20 – gene que codifica a proteína enamelinina (MMP-20)

MMP-20 - proteína enamelinina

Na⁺- sódio

NBCe1 – proteína trocadora de sódio/bicarbonato

NC – nefrocalcinose

NCX1 – gene que codifica a proteína trocadora de sódio/cálcio NCX1

NCX1 – proteína trocadora de sódio/cálcio NCX1

NCX3 - gene que codifica a proteína trocadora de sódio/cálcio NCX3

NCX3 - proteína trocadora de sódio/cálcio NCX3

ng - nanogramas

NHE1 – gene ou proteína trocadora de sódio/prótons de hidrogênio

PCR – reação em cadeia de polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

Polyphen – *Polymorfism Phenotyping* - programa para predição do efeito de uma substituição de aminoácido sobre a estrutura e função de uma proteína

R200Q – substituição da arginina 200 por glutamina

RPM – rotação por minuto

SIFT - *sorting tolerant from intolerant* – programa para análise do efeito da variação de sequência no gene e na proteína

SLC4A2 – gene que codifica a proteína AE2

SNP – polimorfismo de nucleotídeo simples

SNV – variação de nucleotídeo simples

TUFT1 – gene que codifica a proteína tuftelina

U – unidades

UnB – Universidade de Brasília

WDR72 - gene que codifica a proteína *WD repeat domain 72*

ZO-1 – proteína de junção oclusiva *zonula-occludens 1*

µg/ml – micrograma por mililitro

µl - microlitro

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Amelogênese - eventos celulares e moleculares.....	4
2.2 Defeitos de Desenvolvimento do Esmalte e Amelogênese Imperfeita.....	10
2.3 Amelogênese Imperfeita em Pacientes com Doenças Renais Hereditárias...	14
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVOS GERAIS	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Sujeitos da pesquisa.....	21
4.2 Exame clínico geral e exames complementares.....	22
4.3 Exame clínico odontológico.....	23
4.4 Análise de variação de sequência abordando genes candidatos.....	23
4.4.1 Extração de DNA genômico.....	23
4.4.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)	24
4.4.3 Sequenciamento automático.....	26
4.5 Análise de resultados.....	26
5 RESULTADOS	28
5.1 Pacientes com FHHNC.....	29
5.1.1 Pacientes 1 e 2.....	30
5.1.2 Pacientes 3 e 4.....	32

5.1.3 Paciente 5.....	40
5.1.4 Paciente 6.....	45
5.2 Pacientes com ATRd e NC.....	47
5.2.1 Paciente 7.....	47
5.2.2 Paciente 8.....	49
5.2.3 Paciente 9.....	51
5.3 Paciente com deficiência da anidrase carbônica II e osteopetrose com NC.....	52
5.3.1 Paciente 10.....	52
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO.....	65
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
9 ANEXOS.....	77
ANEXO – Parecer do CONEP.....	78
ANEXO II – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	79
ANEXO III – Condições utilizadas na reação de PCR	80
ANEXO IV - lista de primers SLC4A2.....	81
ANEXO V – lista de primers CLDN16 e CLDN19	82

1 INTRODUÇÃO

O esmalte dental é um tecido mineralizado que recobre externamente a coroa dos dentes. Sua formação, ou amelogênese, ocorre por um processo complexo mediado por células epiteliais denominadas ameloblastos (Warshawsky & Smith, 1974). Esse processo envolve a síntese e secreção de uma matriz orgânica que depois é degradada para dar lugar à estrutura cristalina do esmalte.

O esmalte maduro é acelular e sua estrutura é composta por cristais de hidroxiapatita (Robinson *et al*, 1997). Macroscopicamente, sua aparência é translúcida e sua superfície é lisa e regular. No entanto, fatores de origem sistêmica ou ambiental podem interferir na amelogênese e afetar essa estrutura tanto quantitativa como qualitativamente (Pindborg, 1982; Suckling, 1989). Os defeitos de desenvolvimento do tipo qualitativos afetam a espessura e/ou a forma do esmalte e são denominados hipoplasias, enquanto os defeitos quantitativos se manifestam na forma de opacidades restritas, opacidades difusas, e/ou descolorações (FDI, 1992).

Quando os defeitos de esmalte são herdados, associados ou não a outras alterações sistêmicas ou sindrômicas, eles são classicamente denominados Amelogênese Imperfeita (AI) (Crawford *et al*, 2007). Em pacientes com AI, estudos moleculares já identificaram mutações nos genes: *AMELX*, *ENAM*, *FAM83H*, *MMP-20*, *KLK-4*, *WDR72*, *DLX3*, *CNNM4* e *FAM20A*, os quais codificam proteínas expressas durante a amelogênese (Kim *et al*, 2006; Santos *et al*, 2007; Becerik *et al*, 2009; Parry *et al*, 2009; O'Sullivan *et al*, 2011; Wright *et al*, 2011). Na análise de mutação de pacientes com AI, os genes *AMELX*, *ENAM*, *FAM83H*, *MMP-20*, *KLK-4*, e *WDR72* têm sido estudados como os principais genes envolvidos na etiologia da doença. Porém, em apenas cerca de 30% dos casos tem sido identificada alguma

mutação em algum desses genes, sugerindo que outros genes ainda não conhecidos possam estar envolvidos na etiologia da AI (Kim *et al*, 2006; Wright, 2006; Wright *et al*, 2011).

Estudos recentes demonstraram que proteínas que regulam a homeostase ácido-básica intra e extracelular dos ameloblastos, expressas principalmente durante a fase mais tardia da amelogênese, são fundamentais para o desenvolvimento normal do esmalte. Nesse sentido, vários estudos, que incluem análise genômica, experimentos *in vitro*, *ex-vivo* e em animais demonstraram a importância da anidrase carbônica II (ACII), do canal de cloro CFTR, dos trocadores de bicarbonato AE1 e AE2, do trocador de sódio e prótons NHE1, do trocador de sódio e bicarbonato NBCe1 e do extrusor de cálcio NCX1 (Chang *et al*, 2011; Lacruz *et al*, 2011a; Lacruz *et al*, 2011b; Urzua *et al*, 2011) na amelogênese. É interessante observar que essas proteínas também são expressas nos túbulos renais onde exercem papel no controle de trocas iônicas e de solutos durante a diálise para manter a homeostase ácido-básica corporal.

Esses achados sugerem que um defeito molecular em proteínas que participam tanto do controle ácido-básico nos rins como nos ameloblastos possa causar alterações nos rins e no esmalte dentário (Lacruz *et al*, 2011b; Urzua *et al*, 2011). Apesar de ainda não haver estudos que comprovem essa hipótese, já foram relatados severos defeitos de desenvolvimento do esmalte em pacientes afetados por duas doenças renais hereditárias caracterizadas por nefrocalcinose: *Enamel Renal Syndrome* (ERS - OMIM 204690) e Hipomagnesemia e Hiper calciúria Familiar com Nefrocalcinose (FHHNC – OMIM 248250).

As principais manifestações bucais relatadas nos pacientes com ERS são AI hipoplásica, cálculos intrapulpares, retenção de dentes decíduos e permanentes e hamartomas foliculares (MacGibbon, 1972; Hall *et al*, 1995; Dellow *et al*, 1998; Normand de la Tranchade *et al*, 2003; Paula *et al*, 2005; Hunter *et al*, 2007; Martelli-Junior *et al*, 2011a). Nos pacientes com FHHNC, um relato de caso descreveu AI hipoplásica severa, doença periodontal agressiva e maloclusão em duas irmãs (Cetrullo *et al*, 2006).

A etiologia das alterações renais e bucais em pacientes com ERS ainda é desconhecida. Na FHHNC, sabe-se que a hipercalciúria, hipomagnesemia e nefrocalcinose podem ser causadas por mutações nos genes *CLDN16* (Simon *et al*, 1999) ou *CLDN19* (Konrad *et al*, 2006) que codificam as junções oclusivas claudina-16 e claudina-19. Essas isoformas de claudinas controlam a reabsorção paracelular de cálcio e magnésio nos rins (Hou *et al*, 2009). A etiologia da AI em pacientes com FHHNC também ainda não está definida e ainda não há estudos que demonstrem a expressão dessas proteínas em ameloblastos (Joao & Arana-Chavez, 2004; Inai *et al*, 2008; Hata *et al*, 2010),

A nefrocalcinose é uma condição rara caracterizada por calcificações difusas no parênquima renal que também pode estar associada a outras doenças renais hereditárias (Montserrat *et al*, 1979). Apesar de escassos, alguns relatos de caso já descreveram AI em pacientes com nefrocalcinose e outras doenças renais como osteopetrose (Ismail *et al*, 1997), rim policístico (Suda *et al*, 2006), osteíte fibrosa e acidose tubular renal distal (ATRD) (Elizabeth *et al*, 2007).

Esses estudos sugerem que pacientes portadores de doenças renais hereditárias e nefrocalcinose possam apresentar AI, mas ainda não há estudos que comprovem essa associação. Em razão da morbidade associada à progressão da nefrocalcinose, tem-se recomendado que pacientes com AI sejam sempre referidos à avaliação nefrológica, e que pacientes com nefrocalcinose também sejam sempre examinados por odontólogos (Paula *et al*, 2005; Elizabeth *et al*, 2007; Hunter *et al*, 2007; Kirzioglu *et al*, 2009). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar e descrever as manifestações bucais de pacientes com diagnóstico de doenças renais hereditárias e nefrocalcinose e realizar análise de variação de sequência com abordagem de genes candidatos em pacientes com AI e FHHNC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AMELOGÊNESE - eventos celulares e moleculares:

O esmalte dentário é um tecido acelular não vital e mineralizado que recobre externamente a coroa dos dentes. Na dentição humana, a amelogênese da dentição decídua se inicia por volta da 14ª semana de vida intrauterina e se completa muito antes do período de erupção dos dentes na cavidade bucal. Na dentição permanente, a amelogênese de todos os dentes, com exceção dos terceiros molares, se completa ainda durante a infância (Lunt & Law, 1974).

A amelogênese é um processo de biomineralização altamente dinâmico e envolve complexos mecanismos celulares e físico-químicos. Os ameloblastos são células epiteliais de origem ectodérmica derivadas da crista neural responsáveis pela síntese e secreção das proteínas da matriz orgânica, pelo controle da mineralização e da maturação do esmalte, e ainda exercem função protetora do esmalte maduro até o momento em que a coroa do dente será exposta ao meio bucal (Bawden & Wennberg, 1979; Leblond & Warshawsky, 1979; Takano *et al*, 1989) (figura 1).

Basicamente, a amelogênese pode ser dividida em três fases histológica e funcionalmente distintas: pré-secreção, secreção e maturação. A fase pré-secretora é caracterizada pela morfodiferenciação dos ameloblastos (figura 1 – número 1). Diversos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação e sinalização celular durante a amelogênese já foram identificados, porém o mecanismo completo de regulação ainda não foi completamente esclarecido (Zeichner-David *et al*, 1995; Thesleff & Aberg, 1997; Michon *et al*, 2010).

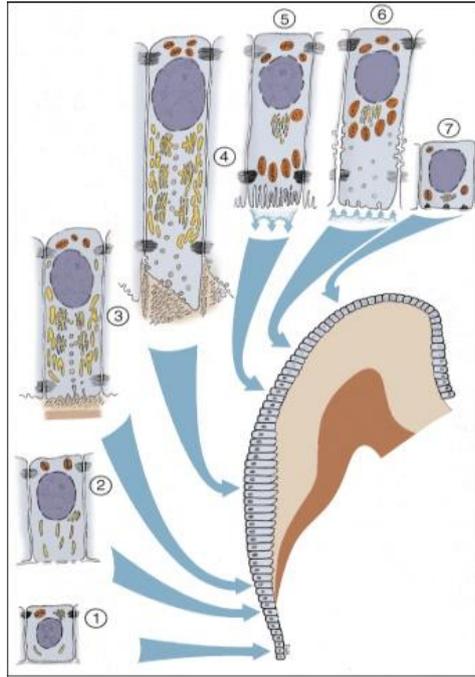


Figura 1: Fases da amelogenese. 1-2: fase de pré-secreção; 3-4: fase de secreção; 5-7: fase de maturação. 1-2: pré-ameloblastos em diferenciação; 3: ameloblastos diferenciados e início da secreção; 4: formação dos processos de Tomes e secreção das proteínas do esmalte pelos sítios apical e laterais; 5: fase de maturação ilustrando ameloblastos com borda estriada; 6: fase de maturação ilustrando ameloblastos com borda lisa; 7: ameloblastos com tamanho e metabolismo reduzido. As células reduzidas formam um epitélio reduzido que protegerá o esmalte até a erupção do dente. Em todas as fases, nas porções basolaterais das células, são expressas proteínas de junções oclusivas (Adaptado de Nanci, 2003).

Na fase de secreção, os ameloblastos aumentam o metabolismo e adquirem prolongamentos distais secretores conhecidos como processos de Tomes (Leblond & Warshawsky, 1979) (figura 1 – números 3 e 4). Cerca de 60 a 90% das proteínas secretadas que compõe a matriz orgânica do esmalte são amelogeninas (Snead *et al*, 1988). O restante da matriz orgânica é composto por proteínas não-amelogeninas: enamelinina (Hu *et al*, 1997), tuftelina (Deutsch *et al*, 1995; MacDougall *et al*, 1998), e ameloblastina (Krebsbach *et al*, 1996). Estudos sugerem que as amelogeninas formem ultraestruturas nanoesféricas que direcionam o crescimento dos primeiros cristais de esmalte (Fincham *et al*, 1995). Já as funções das proteínas não-amelogeninas ainda não foram totalmente elucidadas (Fincham *et al*, 1999; Paine & Snead, 2005; Sire *et al*, 2007).

Nas porções basolaterais dos ameloblastos, estruturas em forma de cinto constituídas por proteínas como a *zonula occludens* (ZO-1) e por diferentes isoformas da claudina (1, 4, 7, 8 e 10) formam junções oclusivas intercelulares importantes para criar uma barreira celular que limite o compartimento no qual são depositadas essas proteínas da matriz orgânica que dará lugar ao futuro esmalte (Sasaki *et al*, 1982; Joao & Arana-Chavez, 2004; Bello *et al*, 2007; Inai *et al*, 2008; Hata *et al*, 2010) (figura 1).

Cerca de 30% da matriz orgânica recém-depositada sofre degradação proteolítica pela ação da enamolisina (MMP-20) e o espaço da matriz orgânica passa a ser substituído pelos primeiros cristais de hidroxiapatita ainda durante a fase de secreção (Fukae *et al*, 1998; Bartlett & Simmer, 1999; Lu *et al*, 2008). Os cristais são formados seguindo-se um arranjo orientado pela deposição das proteínas pelos sítios secretores laterais e apicais dos processos de Tomes. A deposição pelo sítio apical determina a orientação dos prismas em bastões de esmalte e a deposição pelos sítios laterais, dos interbastões (Nishikawa, 1992) (Figura 1 – número 4). A composição química dos bastões e interbastões é a mesma, mudando-se apenas a direção dos cristais.

Na fase de transição para a fase de maturação, as junções oclusivas ZO-1, ocludina e diferentes isoformas de claudinas (1, 4, 5, 6, 7, 8, e 10) passam a ser importantes para criar uma barreira celular permeável que permita a passagem paracelular seletiva de íons e de produtos degradados e água (Joao & Arana-Chavez, 2004; Bello *et al*, 2007; Inai *et al*, 2008; Hata *et al*, 2010) (Figura 2 - página 8). Nessa etapa, os ameloblastos retraem os processos de Tomes e entram em um fenômeno cíclico com alternância da localização das junções oclusivas, da anatomia das bordas apicais e do pH (Figura 2). Todas essas variações parecem ser necessárias para que ocorra a maturação do esmalte (Skobe *et al*, 1985).

Sugere-se que o pH no esmalte adjacente aos ameloblastos com borda lisa seja da ordem de 7.0-7.2 e da ordem de 5.0-6.0 aos ameloblastos com a borda estriada (Sasaki *et al*,

1991). O influxo de íons, principalmente cálcio e fosfato, parece ocorrer na fase de bordos estriados e a reabsorção de produtos degradados da matriz orgânica do esmalte, na fase de bordos lisos (Bartlett & Simmer, 1999; Simmer & Hu, 2002; Lu *et al*, 2008) (Figura 2). Essa degradação proteolítica da matriz orgânica é conferida pela ação da MMP-20 que continua a ser secretada e da kaliceína-4 (KLK-4) que passa a ser secretada na fase de maturação (Simmer & Hu, 2002).

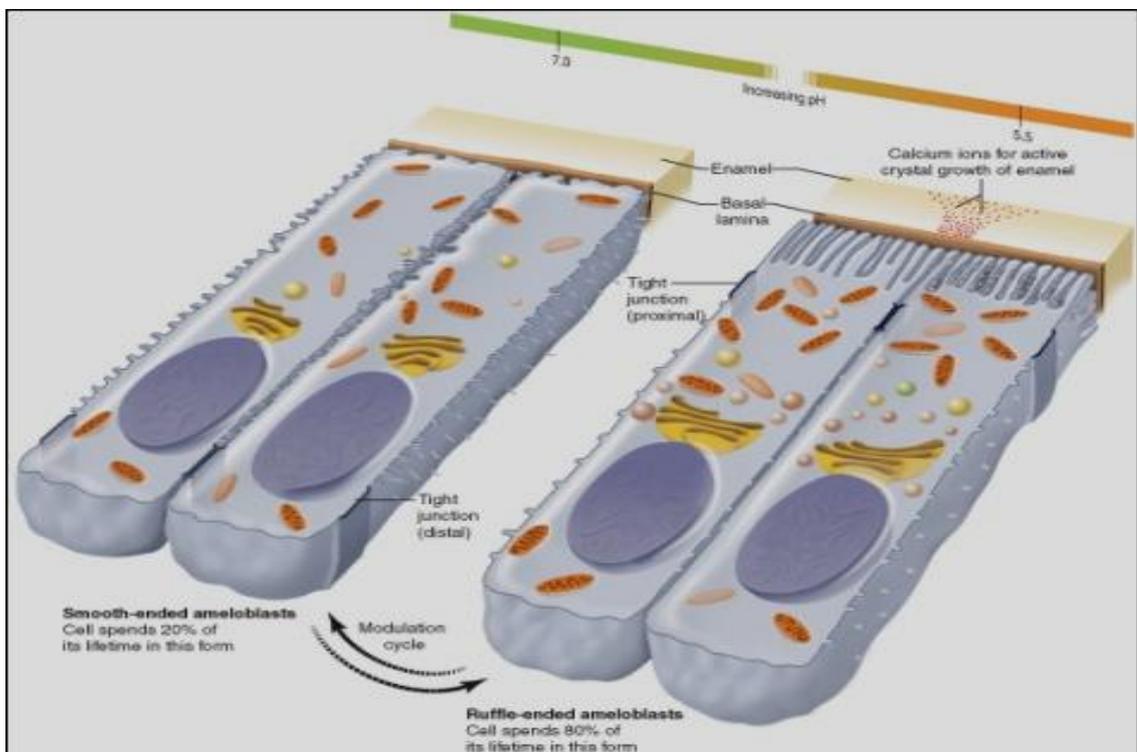


Figura 2: Ameloblastos na fase de transição para a maturação. A figura ilustra a alternância da anatomia apical variando entre bordos lisos e estriados com variação do pH. Na fase de bordos lisos (pH 7.0), ocorre a reabsorção dos produtos degradados e na fase de bordos estriados (pH 5.0), ocorre o influxo de íons cálcio e fosfato. As junções oclusivas também se localizam mais apical ou basalmente dependendo da anatomia apical e da função celular. Na fase de bordos lisos, as junções parecem deixar o espaço intercelular mais frouxo para permitir a reabsorção dos produtos degradados por difusão entre as células (Adaptado de Nanci, 2003).

Um dos fatores que contribui para a variação de pH na amelogênese é o consumo de fosfatos durante a formação dos cristais de hidroxiapatita. A cada mol de hidroxiapatita formada ocorre a liberação de 4 a 14 moles de H^+ (Simmer & Fincham, 1995). Assim, à

medida que os cristais são formados e aumentam de largura, o pH diminui e deve ser tamponado. Para neutralizar esses prótons e manter o pH fisiológico é necessário um mecanismo que mantenha a homeostase ácido-básica (Lacruz *et al*, 2011b).

Estudos prévios já haviam demonstrado que o controle ácido-básico tinha participação de bombas vacuolares de prótons do tipo H⁺ATPases e da enzima ACII, que catalisa a reação que converte dióxido de carbono (CO₂) e água (H₂O) em gás carbônico (H₂CO₃) (Sasaki & Garant, 1986; Sasaki *et al*, 1988; Sasaki *et al*, 1991; Lin *et al*, 1994; Toyosawa *et al*, 1996).

Mais recentemente, outros estudos demonstraram que durante a maturação do esmalte, também ocorre a expressão da anidrase carbônica VI (ACVI) (Smith *et al*, 2006); dos trocadores de cloro/bicarbonato AE1 e AE2; do trocador de sódio/bicarbonato NBCe1; do trocador de sódio/prótons NHE1 (Lyaruu *et al*, 2008; Chang *et al*, 2011; Josephsen *et al*, 2011; Lacruz *et al*, 2011b); e do trocador de cloro CFTR (Sui *et al*, 2003; Bronckers *et al*, 2011; Chang *et al*, 2011; Lacruz *et al*, 2011b).

Os mecanismos que levam o cálcio aos sítios de mineralização ainda não foram completamente esclarecidos. Um estudo de autoradiografia identificou cálcio tanto no meio intracelular como intercelular de ameloblastos, sugerindo a existência de um mecanismo de passagem paracelular (Kawamoto & Shimizu, 1997). Outros estudos sugerem que o maior influxo de cálcio até o esmalte seja mediado por mecanismos ativos que regulam a passagem transcelular (Bawden & Wennberg, 1979; Bawden, 1989; Takano *et al*, 1989). A imunolocalização de ATPases de cálcio (Sasaki & Garant, 1986; Sasaki *et al*, 1987; Zaki *et al*, 1996) e dos extrusores de cálcio NCX1 e NCX3 (Okumura *et al*, 2010; Lacruz *et al*, 2011b) na membrana lateral e distal de ameloblastos na fase inicial da maturação reforça que esse processo seja mediado por mecanismos ativos. Uma ATPase de cálcio e magnésio também já

foi localizada na membrana dos ameloblastos na fase de maturação, indicando um processo ativo de transporte dependente de magnésio (Salama *et al*, 1987; Salama *et al*, 1989).

Embora diversos estudos tenham contribuído para o melhor entendimento dos mecanismos de aporte de cálcio até a frente de mineralização, é possível que existam outras proteínas ainda não identificadas que estejam envolvidas nesse processo (Lacruz *et al*, 2011b; Urzua *et al*, 2011).

Em estudos mais recentes, algumas proteínas ainda com função desconhecida foram imunolocalizadas durante a fase maturação tais como: amelotina (Iwasaki *et al*, 2005; Gao *et al*, 2010), apin/odam (Moffatt *et al*, 2006), FAMH83 (Kim *et al*, 2008), CNNM4 (Parry *et al*, 2009), WDR72 (El-Sayed *et al*, 2009) e FAM20A (O'Sullivan *et al*, 2011). Algumas dessas proteínas parecem se concentrar na região entre o esmalte em maturação e os ameloblastos (Gao *et al*, 2010; Somogyi-Ganss *et al*, 2011) e outras parecem estar associadas a vesículas intracelulares (Ding *et al*, 2009), mas as funções de todas essas proteínas ainda são desconhecidas.

No final da amelogênese, aproximadamente 90% do volume e 95% em peso do esmalte maduro é de natureza inorgânica, composto por cristais de hidroxiapatita. O arranjo cristalino regular, o grau de mineralização e a ausência de restos de proteínas degradadas são importantes para conferir translucidez ao esmalte. No esmalte maduro, apenas cerca de 1% é composto por proteínas remanescentes e o restante do volume é preenchido por água. Finalizada a maturação do esmalte, alguns ameloblastos sofrem apoptose, o restante reduz de tamanho e forma um epitélio reduzido que exerce função protetora até o período de erupção do dente, quando esse epitélio se funde com o epitélio oral e a coroa do dente é exposta à cavidade oral.

Após formado, o esmalte é acelular e inerte, sendo susceptível somente a um processo físico-químico de desmineralização e remineralização dos cristais de

hidroxiapatita em situações de queda do pH bucal em razão da variação dos produtos de saturação de cálcio e fosfato na saliva. O esmalte normal tem aspecto translúcido, deixando transparecer a coloração da dentina subjacente, e sua superfície é lisa e regular cobrindo toda a coroa do dente.

2.2 DEFEITOS DE DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE E AMELOGÊNESE IMPERFEITA:

Alguns fatores ambientais, traumáticos, sistêmicos ou genéticos podem afetar uma ou mais fase da amelogênese produzindo defeitos de desenvolvimento do esmalte (Pindborg, 1982; Suckling, 1989). Basicamente, os defeitos de desenvolvimento do esmalte podem ser classificados em dois tipos: defeitos qualitativos ou quantitativos (FDI, 1992).

As opacidades são defeitos qualitativos resultantes de alterações na maturação do esmalte. Elas se manifestam como alterações na translucidez do esmalte e podem ser restritas, difusas, ou em alguns casos, lineares. Descolorações amareladas, castanhas ou marrons também podem estar associadas aos defeitos qualitativos. Elas podem ser causadas pela retenção de proteínas ou pela disposição irregular dos bastões e interbastões que resulta em mudança no padrão de refração da luz (FDI, 1992).

As hipoplasias são defeitos quantitativos, provocados por alterações na espessura ou na regularidade superficial do esmalte. Em geral, representam distúrbios da função celular e podem variar de defeitos localizados na forma de pontos ou depressões, linhas horizontais, diminuição da espessura ou até ausência completa do tecido (Suckling, 1989; FDI, 1992).

Os defeitos de desenvolvimento do esmalte podem estar ligados a distúrbios temporários como no caso de fatores ambientais ou traumáticos, ou ligados a distúrbios persistentes, como no caso de doenças de caráter genético. Quando associados a fatores

ambientais ou distúrbios temporários, apenas o esmalte do grupo de dentes que estava se formando no período da presença do fator etiológico é afetado. Quando o distúrbio está presente durante todo o período de formação do esmalte, como ocorre nas doenças genéticas, os defeitos podem ser observados tanto na dentição decídua como na permanente e, em geral, afeta um grupo maior de dentes ou toda a dentição.

Diversos fatores não genéticos podem afetar a amelogênese como: traumatismos no germe dentário, transfusões sanguíneas durante a infância, (Pindborg, 1982; Sarnat & Moss, 1985; Brook *et al*, 1997), quadros de hipocalcemia severa (Sarnat & Moss, 1985; Lozupone & Favia, 1989; Limeback *et al*, 1992; Bonucci *et al*, 1994; Acevedo *et al*, 1996; Chardin *et al*, 1998; Nanci *et al*, 2000; Acevedo *et al*, 2002; Yamaguti *et al*, 2005), hipofosfatemia (Limeback *et al*, 1992; Souza *et al*, 2010), ingestão excessiva de flúor (Bronckers *et al*, 2009a), entre outros. Em pacientes com insuficiência renal crônica também já foi relatada maior prevalência de defeitos de desenvolvimento do esmalte, cuja etiologia tem sido atribuída aos distúrbios no metabolismo do cálcio, fósforo e vitamina D presentes na falência renal (Koch *et al*, 1999; Nunn *et al*, 2000; Al-Nowaiser *et al*, 2003; Proctor *et al*, 2005).

Nos últimos anos, o efeito do controle do pH durante a amelogênese também vem sendo melhor estudado. Estudos *in vitro* já haviam demonstrado que pequenas modificações no pH do meio podem afetar o agrupamento das amelogeninas produzindo uma desorganização estrutural dos bastões de esmalte (Moradian-Oldak *et al*, 1998; Wiedemann-Bidlack *et al*, 2007). Mais recentemente, por meio de estudos em modelos animais experimentais transgênicos, também foi comprovada a importância das proteínas que participam do controle do pH durante a amelogênese para o desenvolvimento normal do esmalte. Até o momento, já foram evidenciados defeitos de desenvolvimento do esmalte em animais nocauteados ou silenciados para a expressão de ACII (Wang *et al*, 2010), CFTR (Wright *et al*, 1996; Arquitt *et al*, 2002; Sui *et al*, 2003; Bronckers *et al*, 2011; Chang *et al*,

2011), AE2 (Lyaruu *et al*, 2008; Bronckers *et al*, 2009b; Chang *et al*, 2011), NHE1 (Josephsen *et al*, 2011), e NBCe1 (Paine *et al*, 2008; Lacruz *et al*, 2010b).

Quando os defeitos de desenvolvimento do esmalte têm caráter hereditário, a doença é classificada como Amelogênese Imperfeita (AI). O termo AI já foi utilizado para definir as doenças hereditárias que afetavam somente o esmalte sem qualquer outro envolvimento sistêmico (Rao & Witkop, 1971). Porém, o conceito mais atual define AI como um grupo de condições herdadas que afeta parcialmente ou toda a dentição decídua e/ou permanente, associado, ou não, a outras alterações sistêmicas ou síndromes (Aldred *et al*, 2003; Crawford *et al*, 2007).

A AI pode ter modo de herança autossômica dominante, autossômica recessiva, ou ligada ao cromossomo X. Sua prevalência, dependendo da população estudada varia de 1:800 (Backman & Holmgren, 1988) a 1:14.000 (Witkop, 1957). Autores sugerem que o diagnóstico diferencial deva ser feito com a tentativa de estabelecimento do modo de herança, da definição do fenótipo, e da exclusão de qualquer correlação dos defeitos com fatores ambientais ou distúrbios temporários (Aldred & Crawford, 1995).

Na última década, foram identificadas mutações em pacientes com AI nos genes: *AMELX* (Lagerstrom *et al*, 1991; Wright *et al*, 2003) e *ENAM* (Rajpar *et al*, 2001; Caterina *et al*, 2002; Kida *et al*, 2002; Hart *et al*, 2003), que codificam respectivamente as proteínas da matriz orgânica do esmalte: amelogenina e enamelinina. Também já foram descritas mutações nos genes que codificam as proteinases MMP-20 (Kim *et al*, 2005; Ozdemir *et al*, 2005a; Ozdemir *et al*, 2005b; Papagerakis *et al*, 2008) e KLK-4 (Wright *et al*, 2006) e das proteínas FAMH83 (Kim *et al*, 2008) e WDR72 (El-Sayed *et al*, 2009). Mutações nesses genes provocam AI do tipo hipoplásica, hipomaturada ou hipomineralizada, sem qualquer envolvimento aparente com outra condição sistêmica.

Em pacientes com AI associada a outras manifestações sistêmicas, já foram relatadas mutações no gene homeobox *DLX3* em pacientes com problemas esqueléticos (Price *et al*, 1998), no gene *CNNM4* em pacientes com alterações visuais (Parry *et al*, 2009) e no gene *FAM20A* em pacientes com fibrose gengival, problemas de erupção dentária e espessamento da mucosa dos seios paranasais (dos Santos Neto *et al*, 2011; O'Sullivan *et al*, 2011)

Atualmente, a análise de mutação em pacientes com AI tem abordado principalmente seis genes: *AMELX*, *ENAM*, *MMP-20*, *KLK-4*, *FAMH83*, e *WDR72* (Kim *et al*, 2006; Wright, 2006; Santos *et al*, 2007; Becerik *et al*, 2009; Wright *et al*, 2011). Os resultados dos estudos, no entanto, demonstram que apenas cerca de 30% das famílias estudadas apresentam mutação em algum desses genes, sugerindo que outros genes ainda não estudados estejam envolvidos na etiologia da AI (Kim *et al*, 2006; Becerik *et al*, 2009; Wright *et al*, 2011).

Em razão dos avanços no conhecimento sobre os mecanismos e proteínas envolvidas no controle do pH durante a amelogênese, alguns autores têm sugerido que também seja realizada a abordagem dos genes: *SLC4A2*, *SLC4A4*, *NHE1*, *ACII*, e *CFTR* que codificam respectivamente as proteínas: AE2, NBCe1, NHE1, ACII e CFTR, para diagnóstico de casos de AI com etiologia não definida (Lacruz *et al*, 2011a; Urzua *et al*, 2011). Em humanos, alguns relatos de caso já descreveram defeitos no esmalte de pacientes com acidose metabólica (Winsnes *et al*, 1979; Koppang *et al*, 1984; Ismail *et al*, 1997; Demirci *et al*, 2006; Elizabeth *et al*, 2007).

Apesar da demonstração da expressão dessas proteínas por ameloblastos ser recente, sua expressão e função nos túbulos renais são bem conhecidas. Todas elas desempenham importante papel na troca de ânions e solutos para controlar a homeostase ácido-básica e hidroeletrólítica dos fluidos corporais, mantendo o pH sanguíneo na faixa de 7.34.

2.3 AMELOGÊNESE IMPERFEITA EM PACIENTES COM DOENÇAS RENAIS HEREDITÁRIAS:

Ainda não há evidências científicas que comprovem que uma mutação possa estar diretamente envolvida na etiologia de distúrbios renais hereditários e AI em humanos. Porém, em pacientes portadores de ERS (OMIM 204690) e FHHNC (248250), duas doenças autossômicas recessivas raras em que os pacientes apresentam nefrocalcinose, já foi descrita AI hipoplásica severa (MacGibbon, 1972; Lubinsky *et al*, 1985; Hall *et al*, 1995; Normand de la Tranchade *et al*, 2003; Paula *et al*, 2005; Cetrullo *et al*, 2006; Martelli-Junior *et al*, 2011a).

A nefrocalcinose é uma condição rara caracterizada pela deposição difusa de cálcio no parênquima renal. Os principais mecanismos que promovem a formação dos primeiros sítios de calcificação parecem estar relacionados a condições que levam a um quadro de hipercalcemia ou hipercalciúria, mas ela também pode estar associada ao aumento de urato ou oxalato, ou à diminuição de inibidores da cristalização como o citrato (Sayer *et al*, 2004).

A manifestação da nefrocalcinose pode ser clínica, a nível funcional ou subclínica, a nível microscópico. Em geral, ela é assintomática e o diagnóstico é realizado por meio de radiografia, ecografia, ultrassonografia ou, com maior precisão, por meio de tomografia computadorizada.

Sugere-se que, inicialmente, ocorra a formação de cristais de fosfato ou oxalato de cálcio no interior dos túbulos ou no ducto coletor que, após adesão na superfície epitelial, são transportados por endocitose e acumulam no interstício (Lieske & Toback, 1993; Evan *et al*, 2004; Sayer *et al*, 2004). Diferentes distúrbios metabólicos e síndromes com disfunções tubulares como: ATRd, hiperparatireoidismo, osteopetrose, hiperoxalúria, uso prolongado de medicamentos como corticóides, furosemida, intoxicação por vitamina D, e outras síndromes

com comprometimento do equilíbrio da homeostase hidroeletrolítica também podem induzir a nefrocalcinose (Sayer *et al*, 2004).

Na ERS e na FHHNC, a nefrocalcinose está sempre presente e por esse motivo tem sido considerada um fator patognomônico para se estabelecer o diagnóstico (Praga *et al*, 1995; Martelli-Junior *et al*, 2011a). Além de nefrocalcinose e AI hipoplásica, os pacientes com ERS apresentam dentes amarelados, calcificações intrapulpare, alteração na cronologia de erupção, retenção prolongada de dentes decíduos, dentes permanentes inclusos e hamartomas foliculares (MacGibbon, 1972; Lubinsky *et al*, 1985; Hall *et al*, 1995; Phakey *et al*, 1995; Dellow *et al*, 1998; Normand de la Tranchade *et al*, 2003; Paula *et al*, 2005; Elizabeth *et al*, 2007; Martelli-Junior *et al*, 2011a). Quando a doença renal não é diagnosticada precocemente, os pacientes podem evoluir com perda progressiva da função renal chegando ao quadro de doença renal crônica com várias de suas complicações tais como: hipertensão (MacGibbon, 1972), hiperparatiroidismo secundário (Dellow *et al*, 1998) e proteinúria (Dellow *et al*, 1998; Hunter *et al*, 2007).

A etiologia da ERS ainda não foi definida. Até o momento, a nefrocalcinose é a única manifestação sistêmica relatada. Em alguns casos assintomáticos, o paciente procura primeiramente o dentista em razão das manifestações bucais, sensibilidade dentinária e queixa estética (Paula *et al*, 2005; Martelli-Junior *et al*, 2011a). Assim, em 2009, a fim de se detectar casos de ERS não diagnosticados, Kirzioglu *et al*, encaminharam 17 pacientes com AI hipoplásica sem diagnóstico definido para avaliação nefrológica. Cinco pacientes apresentaram áreas de calcificação renal, reforçando a necessidade da avaliação nefrológica de pacientes com AI e da avaliação odontológica de pacientes com nefrocalcinose.

Nos casos de FHHNC, apesar de vários trabalhos relatarem as manifestações clínicas e o genótipo dos pacientes, as manifestações bucais não têm sido descritas (Konrad *et al*, 2006; Konrad *et al*, 2008; Haisch *et al*, 2011). Até o momento, apenas um estudo descreveu

as manifestações bucais de duas irmãs com FHHNC, nas quais foram observadas severas hipoplasias de esmalte, gengivite, perda de osso alveolar, má-oclusão classe III de Angle e mordida cruzada posterior (Cetrullo *et al*, 2006).

A FHHNC é uma doença hereditária rara caracterizada pela reabsorção insuficiente de cálcio e magnésio do lúmen tubular para os capilares induzindo à hipermagnesúria, hipomagnesemia, hipercalcúria e nefrocalcinose (Praga *et al*, 1995; Weber *et al*, 2000). Clinicamente, os pacientes com FHHNC apresentam infecções urinárias recorrentes, poliúria e /ou polidipsia, nefrolitíase, déficit no crescimento, vômitos, dores abdominais, episódios de tetania, ou câimbras generalizadas. Em geral, a função renal já se encontra comprometida quando a doença é diagnosticada, e cerca de 1/3 dos pacientes desenvolvem perda da função renal antes da adolescência.

Mesmo antes do estágio crônico da insuficiência renal, os pacientes apresentam altos valores de paratormônio (PTH). O aumento do PTH ocorre para compensar a perda renal de cálcio. Em função do aumento do PTH, o cálcio dos ossos são removidos para o plasma, mantendo na maioria das vezes a calcemia em valores próximos ao normal. Os pacientes podem ainda apresentar ATRd, hipocitraturia ou hiperuricemia. As manifestações extra-renais mais comumente relatadas são alterações visuais (Weber *et al*, 2001; Haisch *et al*, 2011).

A doença tem modo de herança autossômico recessivo e é considerada uma desordem genética heterogênea, pois pode estar ligada a mutações em duas isoformas da claudina: claudina-16 e claudina-19. Já foram relatadas mutações em homozigose e em heterozigose composta tanto na claudina-16 como na claudina-19 (Simon *et al*, 1999; Konrad *et al*, 2006).

O *CLDN16* está localizado no cromossomo 3 e possui 5 exons que codificam os 305 aminoácidos da claudina-16. A claudina 19 é codificada pelo *CLDN19*, localizado no cromossomo 1, e tem 224 aminoácidos codificados por 5 exons. Nos rins, as duas proteínas

são expressas na porção ascendente espessa da alça de Henle e, em menor grau, no túbulo contorcido distal. As duas claudinas se heterodimerizam e funcionam como barreiras intercelulares.

A claudina-19 pode ter interação *cis* ou *trans* com outra claudina-19 ou *cis* com a claudina-16. Por sua vez, a claudina-16 não tem interação homomérica e só estabelece ligação *cis* com a claudina-19 (Hou *et al*, 2008; Hou *et al*, 2009). Assim, entre duas células adjacentes, a claudina-19 parece ser a principal responsável pelo estabelecimento de uma barreira epitelial semi-permeável.

As claudinas são proteínas estruturais presentes entre as células em regiões de grande interação entre elas conhecidas como tight junction (TJ - junções celulares estreitas ou intensas). Nessas regiões as claudinas regulam a permeabilidade paracelular (entre as células). Essa regulação é complexa e envolve uma seletividade na condutância de alguns cátions, como se formasse um “canal paracelular” de cátions. Por essa razão, mutações nas claudinas prejudicam a absorção de cálcio e magnésio. No ramo espesso da alça de Henle, elas atuam na regulação da absorção de sódio e cloro, criando uma diferença de voltagem transepitelial entre o interstício e o lúmen tubular e favorecendo a absorção por difusão paracelular de cátions divalentes como Ca^{+2} e Mg^{+2} (Himmerkus *et al*, 2008; Hou *et al*, 2009; Shan *et al*, 2009). A princípio, essa absorção deveria ocorrer sem resistência, no entanto a passagem paracelular desses cátions depende da presença da claudina-16 e claudina 19.

Isso é muito importante pois é na porção ascendente espessa da alça de Henle que ocorre a maior parte (65 a 75%) da reabsorção do magnésio por difusão paracelular e o restante é reabsorvido por mecanismos ativos no túbulo contorcido distal. Em situações normais, menos de 5% do magnésio filtrado aparece na urina (Knoers, 2008). Alguns estudos funcionais já demonstraram que algumas mutações induzem à perda parcial, outras à perda

total da atividade da proteína, determinando o fenótipo da doença (Konrad *et al*, 2006; Konrad *et al*, 2008).

O fenótipo extra-renal também pode variar em função da proteína mutada. Pacientes com mutação na claudina-16 podem ou não, apresentar alterações visuais. Quando presentes, as alterações são astigmatismo, miopia, hipermetropia, e/ou estrabismo (Weber *et al*, 2000; Konrad *et al*, 2006). Mutações na claudina-19 parecem estar relacionadas a alterações mais severas como coloboma macular, miopia severa, e nistagmo horizontal (Haisch *et al*, 2011). Isso pode ser explicado por estudos experimentais que detectaram alta expressão de claudina-19 no epitélio pigmentar da retina de peixes (Konrad *et al*, 2006). Além disso, estudos mais recentes relataram intolerância a exercícios físicos em pacientes com mutações da claudina-19 (Faguer *et al*, 2011). Algumas evidências sugerem que os indivíduos heterozigotos que possuam um dos alelos da claudina-16 mutado também possam apresentar hipercalciúria, nefrolitíase, nefrocalcinose (Praga *et al*, 1995; Weber *et al*, 2001), ou hipomagnesemia (Blanchard *et al*, 2001).

Em virtude do fenótipo com alterações visuais mais severas, pacientes com mutação na claudina-19 passaram recentemente a serem agrupados em um novo grupo denominado hipomagnesemia 5 com envolvimento renal e ocular (HOMG5 - OMIM 248190).

Além dos casos de FHHNC, HOMG5 e ERS, há alguns relatos de casos esporádicos de pacientes portadores de outras doenças renais hereditárias e nefrocalcinose que apresentaram fenótipo de AI. Em 1997, Smail *et al* relataram um caso de um paciente com deficiência da ACII que apresentou osteopetrose, nefrocalcinose, defeitos de esmalte hipoplásicos, maloclusão, retenção de dentes decíduos e permanentes (Ismail *et al*, 1997). Em 2006, Suda *et al* relataram um caso de mutação no gene homeobox *MSX2* em um paciente com rim policístico, nefrocalcinose, AI hipomaturada e fenda labial e palatina (Suda *et al*, 2006). Em 2007, um estudo identificou AI hipoplásica em uma paciente com ATRd e

nefrocalcinose e em uma paciente com osteíte fibrosa e nefrocalcinose (Elizabeth *et al*, 2007).

A ATRd têm sido relatada como uma das principais patologias associadas à nefrocalcinose mas nem todos os pacientes com ATRd apresentam nefrocalcinose (Adams & Rowe, 1992; Mantan *et al*, 2007). A doença pode ser adquirida ou herdada, com modo de herança autossômico dominante ou recessiva (Karet *et al*, 1998; Karet *et al*, 1999; Smith *et al*, 2000; Alper, 2002), e é caracterizada pela secreção tubular de H⁺ deficiente nos túbulos distais. A acidose metabólica crônica diminui a secreção de citrato e aumenta a excreção de cálcio, criando um meio favorável para a nefrolitíase e nefrocalcinose. Mutações em genes que codificam proteínas que constituem subunidades da H⁺-ATPase do tipo vacuolar apical já foram identificadas em famílias com ATRd (Karet *et al*, 1998; Karet *et al*, 1999; Smith *et al*, 2000; Alper, 2002). A expressão dessas proteínas por ameloblastos ainda não foi relatada.

O conjunto desses achados sugere a hipótese de que pacientes com distúrbios da homeostase ácido-básica e hidroeletrólítica nos túbulos renais possam apresentar, concomitantemente, distúrbios renais e defeitos de desenvolvimento do esmalte. Porém, as evidências científicas ainda são escassas e um estudo com maior número de pacientes é necessário para sustentar essa hipótese.

3 OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Descrever as manifestações bucais de pacientes com doenças renais hereditárias com nefrocalcinose e realizar análise de mutação abordando genes candidatos em pacientes que apresentaram fenótipo de AI.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Descrever as manifestações bucais de pacientes com diagnóstico de doença renal hereditária e nefrocalcinose e familiares, em acompanhamento nas clínicas de nefrologia de três hospitais de Brasília, Distrito Federal.

- Realizar análise de variação de sequência abordando-se o gene candidato *SLC4A2*, que codifica a proteína AE2, em um paciente com AI do tipo hipoplásica e hipomaturada, nefrocalcinose e distúrbio renal não diagnosticado.

- Realizar análise de variação de sequência nos genes *CLDN16* e *CLDN19* em três pacientes com FHHNC que apresentaram fenótipo sugestivo de AI e em seus familiares.

4 MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Sujeitos da pesquisa:

Critérios de inclusão:

Todos os pacientes com diagnóstico clínico de alguma doença renal hereditária e nefrocalcinose diagnosticados por meio de exame de ultrassonografia atendidos nas Clínicas de Nefrologia Pediátrica do Hospital Universitário de Brasília (HUB), do Hospital Materno Infantil de Brasília (HMIB) e do Hospital de Base de Brasília (HDB) foram referidos para avaliação na Clínica de Atendimento a Pacientes Portadores de Anomalias de Desenvolvimento Dentário, Divisão de Odontologia, do Hospital Universitário de Brasília (HUB).

O diagnóstico de FHHNC foi estabelecido quando o paciente apresentava magnésio plasmático inferior a 0.7-1.1 mmol/L, e cálcio urinário maior que 4.0 mg/kg/dia e nefrocalcinose diagnosticada por ultrassonografia. O diagnóstico de ATRd foi estabelecido quando o paciente apresentava anion gap urinário positivo, acidose metabólica ($\text{pH} < 7.35$ / $\text{HCO}_3^- < 22$ mEq/L) e pH urinário superior a 5.5 or higher, com potássio normal ou inferior a 3.5 mEq/L. O diagnóstico de osteopetrose foi realizado por meio de tomografia computadorizada.

Os pacientes e responsáveis que concordaram em participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II). Todos os irmãos e os pais dos pacientes estudados também foram avaliados. O estudo tem parecer do CONEP de número 1440/2001 (Anexo I).

4.2 Exame clínico geral e exames complementares:

O exame inicial dos casos índices foi realizado por médicos nefrologistas das clínicas de onde os pacientes foram referidos. Em seguida, todos os pacientes foram novamente examinados por um único médico nefrologista. Os dados foram registrados em um formulário padrão para coleta dos dados pessoais, história familiar, história médica, uso de medicamentos e registro dos resultados de exames bioquímicos de sangue e urina, gasometria venosa, ultrassonografia, densitometria óssea, exame auditivo e exame oftalmológico.

O grau de insuficiência renal foi classificado de acordo com o ritmo de filtração glomerular seguindo os seguintes critérios:

Estágio 0: Fase de função renal normal sem lesão renal.

Estágio 1: Fase de lesão com função renal normal - corresponde às fases iniciais de lesão renal com filtração glomerular preservada, ou seja, o ritmo de filtração glomerular estava acima de $90 \text{ ml/min/1,73m}^2$.

Estágio 2: Fase de insuficiência renal funcional ou leve - início da perda de função dos rins. Paciente apresentava ritmo de filtração glomerular entre 60 e $89 \text{ ml/min/1,73m}^2$.

Estágio 3: Fase de insuficiência renal laboratorial ou moderada – Paciente que apresentava ritmo de filtração glomerular compreendido entre 30 e $59 \text{ ml/min/1,73m}^2$.

Estágio 4: Fase de insuficiência renal clínica ou severa - Ritmo de filtração glomerular entre 15 a $29 \text{ ml/min/1,73m}^2$.

Estágio 5: Fase terminal de insuficiência renal crônica - ritmo de filtração glomerular inferior a $15 \text{ ml/min/1,73m}^2$.

4.3 Exame clínico odontológico:

Todos os pacientes e seus familiares em primeiro grau foram submetidos à anamnese anamnese e exame físico intra e extrabucal. O exame físico intrabucal incluiu principalmente a investigação de presença de lesões de cárie, condição periodontal, registro de defeitos de desenvolvimento de esmalte dentário, presença de calcificações pulpares e avaliação da cronologia de erupção dentária. Para auxiliar o diagnóstico, os pacientes foram submetidos a radiografias panorâmica, periapicais e interproximais. Foram obtidas fotografias extra e intrabucais a fim de se documentar o caso e complementar a avaliação por meio de análise das imagens.

Os defeitos de desenvolvimento de esmalte foram registrados como hipoplasia, opacidade restrita e/ou opacidade difusa. Aspectos como descoloração, forma do defeito e localização também foram registrados para melhor descrição dos defeitos.

A anamnese incluiu investigação sobre exposição ao flúor tópico e sistêmico, história de traumatismo dentário, doenças respiratórias, doenças gastrointestinais, história de transfusão sanguínea, intercorrências durante a gravidez, doenças na primeira infância e medicamentos ingeridos a fim de se excluir a possibilidade de os defeitos terem sido provocados por fatores ambientais ou distúrbios temporários. Todos os pacientes receberam tratamento odontológico preventivo e tratamento restaurador, quando indicado.

4.4 Análise de variação de sequência abordando genes candidatos:

4.4.1 Extração de DNA genômico

Cerca de 3ml de sangue venoso periférico foi coletado de uma das veias do antebraço dos pacientes em tubos com EDTA. O DNA foi extraído pelo método CHELEX-100[®] (WALSH *et al*, 1991), conforme descrito a seguir: um mililitro de água milliQ foi misturado a 50 µl de sangue e, em seguida, a mistura foi centrifugada por 3 min a 5000 rpm. Após descarte do sobrenadante, o procedimento foi repetido. Em seguida, foram adicionados 200µl da suspensão CHELEX-100[®] a 5% em água milliQ, homogeneizando-se a mistura. A amostra foi incubada a 56°C por 30 min e a 100°C por 10 min. Após centrifugação, a amostra foi armazenada a -20°C para posterior utilização.

4.4.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

O DNA genômico extraído foi utilizado como substrato para amplificação dos genes *SLC4A2*, *CLDN16* e *CLDN19* utilizando-se pares específicos de primers iniciadores para cada gene (Anexos IV e V).

Para sequenciar o gene *SLC4A2*, foi utilizada como referência a sequência do gene da base de dados ENSEMBL (ENSG00000164889), transcrito SLC4A2-001 (ENST00000413384), disponíveis no sítio: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000164889;r=7:150754297-150773614;t=ENST00000413384. Os primers (Anexo IV) foram desenhados utilizando-se o programa Exonprimer do Centro Helmholtz disponível no sítio: <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>.

Para os genes *CLDN16* e *CLDN19* foram utilizados primers previamente relatados na literatura (Anexo V) para sequenciar as regiões intron-exon e regiões codificantes (Simon *et al*, 1999; Konrad *et al*, 2006). Para sequenciar a região do promotor do gene *CLDN16*, foi

utilizado, como referência, o trabalho de Efrati *et al*, 2005. Nesse estudo, os autores descreveram maior atividade em ensaio de luciferase em uma região com 210 pares de base compreendidos entre as coordenadas 3:190104206 e 3:190104416, com atividade principal concentrada em uma região com 70 pares de base localizados entre as coordenadas 3:190104206 e 3:190104276 (Efrati *et al*, 2005). A região escolhida para amplificação foi toda a sequência compreendida entre os 210 pares de base. Para o desenho dos primers (anexo V), foi utilizado o programa Exonprimer (Centro Helmholtz: <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>). Como referência, foi utilizada a sequência do gene *CLDN16* (ENSG00000113946) e do transcrito CLDN16-001 (ENST00000264734), disponível na base de dados ENSEMBL (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000113946;r=3:190040330-190129932;t=ENST00000264734). As condições de PCR em todos os experimentos foram mantidas constantes alterando-se apenas a temperatura de anelamento (Anexo III).

Na reação de amplificação, foram utilizados 5 µl de DNA genômico, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP) , 50 ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão de reação e sulfato de magnésio fornecido e usado de acordo com as recomendações do fabricante, resultando em um volume final de 50µl. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. Waltham, MA) no laboratório de Farmacologia Molecular do Departamento de Farmácia e no Laboratório de Pediatria – Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília).

Para confirmação da amplificação dos fragmentos de interesse, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml), visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

4.4.3 Sequenciamento automático

Os produtos da amplificação foram purificados por meio enzimático (sistema “EXO-SAP”). Num volume de 10µl do produto de PCR, foram acrescentados 10U de exonuclease I (Biolabs) e 1U de fosfatase alcalina de camarão (Promega). Em seguida, o produto foi incubado a 37°C por 30 min e depois, a enzima foi inativada a 80°C por 20 min. A purificação dos produtos foi confirmada em gel de agarose a 2%. Aos produtos de PCR purificados, foram acrescentados 50 ng do primer de interesse (*sense* e *antisense* separadamente) e o material foi enviado para o serviço de seqüenciamento da Universidade Católica de Brasília ou para o serviço de seqüenciamento da empresa MACROGEN- Coréia do Sul.

4.5 Análise de resultados:

A análise dos cromatogramas, alinhamentos e comparações entre as seqüências foram realizados com o auxílio dos softwares: Chromas (Technelysium Pty LTD) e Sequencher versão 4.8 demo (Gene Codes Corporation).

As seqüências foram comparadas utilizando-se a como referência as seqüências genômicas e as variações de seqüência descritas na base de dados ENSEMBL Human Gene View disponível em www.ensembl.org/homo_sapiens/geneview.

As variações de seqüência foram submetidas à análise pelo programa *Sorting Intolerant From Tolerant* - SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html) para predição do efeito da alteração de bases e da substituição de aminoácidos sobre o gene e sobre a proteína. Valores menores que 0.05 foram considerados não tolerados e maiores que 0.05, tolerados. As variações com substituição nos aminoácidos também foram submetidas à

análise pelo programa Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) (Ng & Henikoff, 2001). Valores até 0.5 foram considerados benignos e prejudiciais quando foram maiores que 0.5.

Os programas SIFT e Polyphen realizam uma avaliação *in silico* do efeito das alterações no gene e na proteína por meio de análise simultânea em diversas bases de dados. Após o cruzamento das informações, estipula-se uma predição do efeito do SNP sobre a estrutura e função da proteína (Ng and Henikoff, 2001; 2002; 2003; 2006; Kumar *et al*, 2009). Essas ferramentas baseiam-se principalmente no princípio de que posições muito conservadas tendem a ser menos tolerantes a substituições enquanto as regiões menos conservadas tendem a tolerar mais substituições. Sua utilização é importante para direcionar experimentos futuros.

Por meio do programa Polyphen, a sequência de aminoácidos do *Homo sapiens* nas regiões de interesse foi comparada com a sequência de outros animais vertebrados que apresentavam maior homologia da proteína. Esses resultados foram ilustrados para se observar o padrão de conservação do aminoácido na região de interesse.

5 RESULTADOS:

Um total de 10 pacientes de 8 famílias em atendimento nos diferentes serviços de Nefrologia preencheram os critérios de inclusão e fizeram parte do estudo. Nenhum dos 8 pacientes com AI hipoplásica que foram encaminhados da clínica de Odontologia para o exame nefrológico apresentou nefrocalcinose. Todos os pacientes desse estudo foram diagnosticados primeiro pelos serviços de nefrologia e encaminhados para a avaliação odontológica. A distribuição por gênero foi de cinco pacientes do gênero feminino e cinco do gênero masculino. A idade dos pacientes variou entre 4 e 29 anos de idade.

Seis pacientes, incluindo dois pares de irmãos, apresentaram FHHNC, três pacientes apresentaram ATRd com nefrocalcinose e uma paciente apresentou osteopetrose e nefrocalcinose, aparentemente ligada à deficiência da ACII. Em todos os pacientes, a nefrocalcinose era bilateral. A principal manifestação bucal foram defeitos de desenvolvimento do esmalte. Os defeitos variaram de opacidades difusas leves a severas hipoplasias.

5.1 Pacientes com FHHNC

A figura 3 apresenta um resumo com os principais valores encontrados nos exames bioquímicos de sangue e urina e manifestações clínicas na época do diagnóstico, além das manifestações bucais encontradas. Todos os pacientes apresentaram hipomagnesemia e hipercalcúria, altos valores de PTH e defeitos de desenvolvimento dentário com diferente grau de comprometimento e tipo de defeito.

	1	2	3	4	5	6
Consaguinidade	Sim 1º grau	Sim 1º grau	Não	Não	Não	Sim 1º grau
Idade atual	14 anos	16 anos	16 anos	4 anos	10 anos	22 anos
Idade ao diagnóstico	7 anos	9 anos	8 anos	2 anos	3 meses	20 anos
Ca+2 plasmático 8,8-10,2 mg/dL	10,6	9,9	8,8	8,7*	9,1	6,4*
Mg+2 plasmático 1,53-2,55 mg/dL	1,1*	0,97*	1,1*	1,2*	1,0*	0,9*
Creatinina plasmática 0,3-0,7 mg/dL (até 12 anos) 0,5-1,1 mg/dL (fem-adulto)	1*	1,1*	1*	0,7	0,9*	1,9*
Fe Ca+2/Cr <0,22mg/mg	ND	ND	0,48*	ND	0,31*	ND*
Fe Mg+2/Cr 0,154-0,202mg/mg	ND	ND	0,24*	ND	0,82*	ND*
PTH 12-65pg/ml	ND	ND	67,2*	71*	110*	244*
Idade de diagnóstico da perda da função renal	9 anos (desde o diagnóstico)	7 anos (desde o diagnóstico)	8 anos (desde o diagnóstico)	4 anos (diagnóstico recente)	3 meses (desde o diagnóstico)	18 anos (2 anos antes de ser diagnosticada)
Estágio da IRC	Estágio 2	Estágio 2	Estágio 2	Estágio 1	Estágio 3	Estágio 3
Problemas visuais	Miopia Estrabismo Retinopatia	Miopia Estrabismo Retinopatia	Astigmatismo	Não	Não	Miopia
Outras manifestações clínicas	Diabetes tipo I Poliúria Polifagia	Diabetes tipo I ITU Pielonefrite Acidose metabólica	Poliúria	Polidipsia	Convulsões Câimbra Acidose metabólica ITU	ITU
Manifestações bucais	Opacidades difusas Mordida cruzada anterior	Opacidades difusas Mordida cruzada anterior	Opacidades, descoloração e hipoplasia	Hipoplasia	Opacidades, descoloração e hipoplasia	Opacidades restritas e difusas

Figura 3: Resumo dos valores bioquímicos dos exames de sangue e urina e das principais manifestações clínicas dos pacientes com FHHNC (ND=dado não disponível ; * valor fora dos parâmetros de referência; Fe=fração de excreção; ITU= infecção do trato urinário; IRC=insuficiência renal crônica).

5.1.1 Pacientes 1 e 2

Os pacientes 1 e 2 são dois irmãos filhos de pais consangüíneos em primeiro grau (Figura 4).

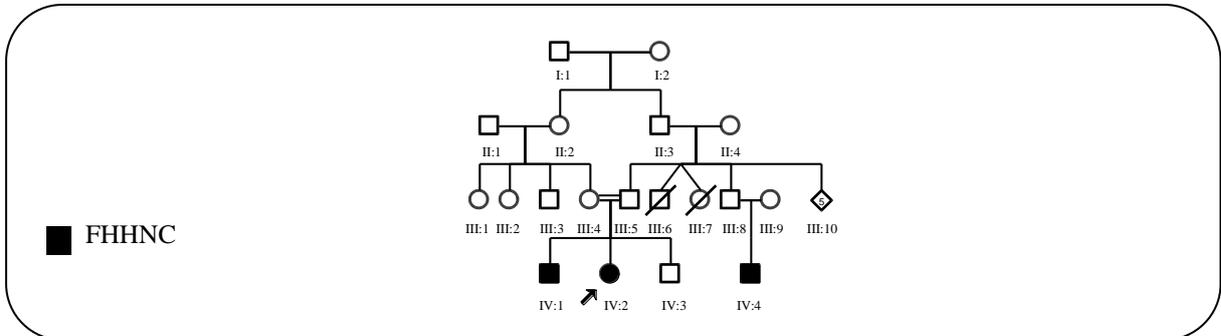


Figura 4: Heredograma da família dos pacientes 1 e 2. História de consangüinidade em primeiro grau entre os pais sugerindo modo de herança autossômico recessivo ou autossômico dominante. O modo de herança autossômico recessivo foi confirmado na análise de variação de sequência do paciente IV:2, mas o primo afetado IV:4 não foi avaliado pois mora em outra cidade.

A paciente 1 (IV:2), gênero feminino, foi submetida a exame físico geral e exames bioquímicos complementares aos 7 anos de idade devido a infecções recorrentes no trato urinário e pielonefrite. A função renal estava levemente comprometida com níveis de creatinina e uréia normais, ritmo de filtração glomerular menor que $89\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$, e lesão renal (estágio 2). Foi diagnosticada acidose metabólica, hipomagnesemia, hipercalcúria, e nefrocalcinose. Além disso, a paciente apresentava miopia progressiva, sopro cardíaco sistólico, estrabismo e diabetes tipo I. Após realizado o diagnóstico de FHHNC, seus dois irmãos também foram avaliados.

O irmão mais velho (IV:1) (paciente 2), com 9 anos de idade na época, apresentou poliúria, polifagia, episódios de desmaios em decorrência de hipoglicemia, diabetes tipo I, miopia progressiva, estrabismo e também apresentou FHHNC.

O irmão mais novo (IV:3), com 3 anos na época do exame, apresentou apenas sopro cardíaco e bom estado de saúde geral. A família relatou que um primo (IV:4) também tem a doença, mas como ele mora em outra cidade, não pôde ser avaliado. A mãe e outros

membros da família materna também apresentam diabetes tipo I (não investigado). Não foram relatados outros membros afetados na família com FHHNC.

Os dois pacientes afetados foram encaminhados para exame odontológico aos 13 e 15 anos de idade. Em ambos os pacientes, foram observadas opacidades difusas e mordida cruzada anterior. Não foi observada doença periodontal. As opacidades observadas na paciente 1 foram mais suaves que as observadas no paciente 2. Nenhum outro membro da família apresentou defeitos de desenvolvimento do esmalte (figura 5).

Esses pacientes não foram submetidos à análise de variação de sequência, pois o fenótipo dos defeitos de desenvolvimento do esmalte era leve.



Figura 5 - Manifestações bucais dos pacientes 1 e 2. A paciente 1 (figuras a e b) apresentou leves opacidades difusas em incisivos e caninos e mordida cruzada anterior. O paciente 2 (figuras c e d) também apresentou mordida cruzada anterior, e opacidades difusas em toda a dentição permanente.

5.1.2 Pacientes 3 e 4:

Os pacientes 3 e 4 são dois irmãos filhos de pais não consangüíneos e únicos membros afetados na família. O heredograma sugeriu modo de herança autossômico recessivo (Figura 6).

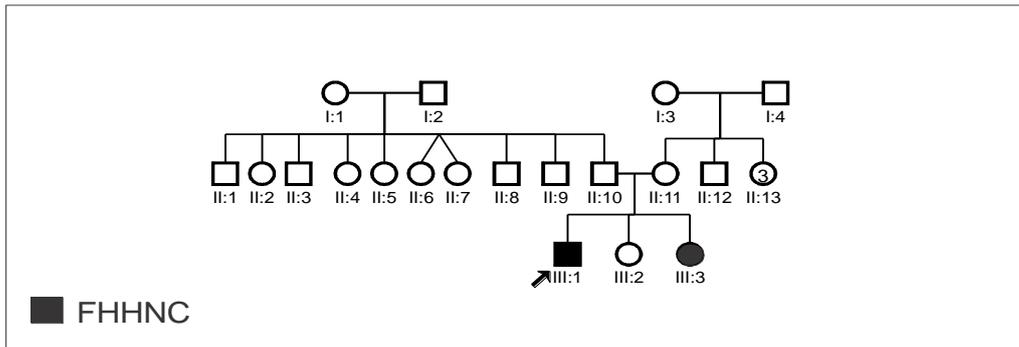


Figura 6: Heredograma da família dos pacientes 3 e 4. Sem história de consangüinidade e ausência de outros membros da família afetados.

O paciente 3 (III-1), gênero masculino, foi encaminhado aos 7 anos de idade para avaliação médica pois apresentava fraqueza muscular e dificuldade para deambular. Foi verificado quadro de hipomagnesemia e nefrocalcinose. Além disso, foi observada poliúria, insuficiência renal leve (estágio 2), hipocalcemia, uricosúria, hipermagnesiúria e hiperfosfatúria discretas. O exame de audiometria não detectou qualquer alteração. Aos 9 anos de idade, foi diagnosticado astigmatismo.

Os pais também foram avaliados e submetidos a exames complementares bioquímicos. O pai apresentou a magneemia no limite inferior da taxa de valores de referência e a mãe relatou história de nefrolitíase. Porém, não foi observada qualquer outra alteração e não foi relatada doença renal em outro membro da família. Uma irmã de 12 anos, com 5 anos de idade na época, também foi avaliada mas não apresentou qualquer alteração.

O paciente foi encaminhado para a avaliação odontológica aos 12 anos de idade com suspeita de alteração tubular na região da alça de Henle sem diagnóstico definido. Ao exame

odontológico, foram observadas opacidades lineares com alteração de cor nos dentes permanentes anteriores com hipoplasias na região cervical (figura 7). Na região posterior, os pré-molares e molares permanentes apresentaram hipoplasias severas (figuras 7 a, b e d). O tecido gengival apresentou aspecto normal (figura 7-e). Ao exame radiográfico, não foram observadas calcificações intrapulpares nem alterações na cronologia de erupção (figura 7-c).

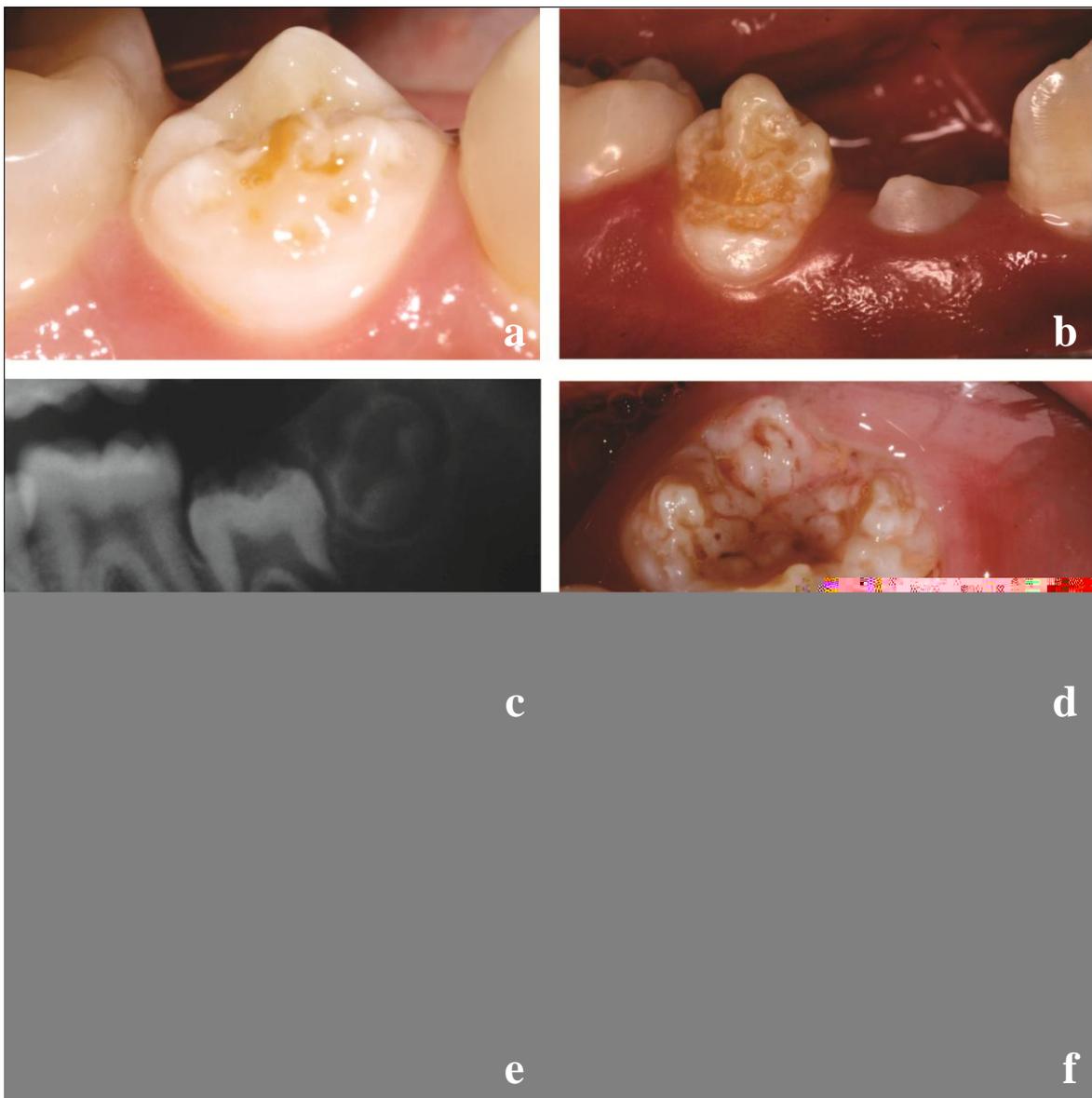


Figura 7 - Manifestações bucais do paciente 3. Hipoplasias de esmalte, opacidades difusas e restritas (lineares) afetando toda a dentição permanente do paciente. A figura c ilustra ausência de calcificações pulpares e a ausência de contraste entre o esmalte e a dentina do dente 37 em uma tomada radiográfica aos 13 anos de idade.

Os pais (II:10 e II:11) e a irmã (III-2) também foram submetidos ao exame odontológico, mas não foi observada qualquer alteração nas manifestações bucais. Inicialmente, o diagnóstico da patologia renal não estava definido, e como o paciente apresentava a associação de AI hipoplásica e hipomaturada, foi realizada análise de variação de sequência abordando-se o gene SLC4A2.

No sequenciamento das regiões codificantes e das junções exon-introns do gene SLC4A2 foram observadas 3 variações de seqüência que já haviam sido descritas como polimorfismos simples de nucleotídeo (SNP) em diferentes populações (figura 8).

O exon 1 não foi analisado por não ser codificante. Na região intrônica entre os exons 3 e 4, foi observada uma substituição na posição 7:150392481 já relatada como SNP com frequência entre 20 a 50% (rs2303930) (figura 8).

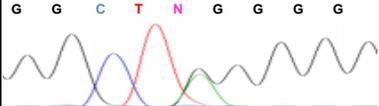
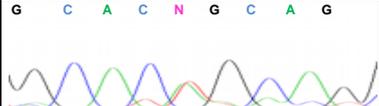
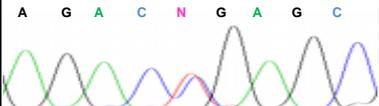
Gene SLC4A2 (ENSG00000164889)					
Região	Alteração	Códon Resultado	Cromatograma	Referência Coordenadas	Frequência
Intron 3	c.218-65A>G heterozigose	Intron		SNP rs2303930 7:150392481	20 a 50%
Exon 6	c.630A>T heterozigose	ACA >ACT T210T silenciosa		SNP rs2229549 7:150763655	25 a 77%
Exon 8	c.1071 T>C heterozigose	ACT >ACC T357T silenciosa		SNP rs2229550 7:150765065	83 a 97%

Figura 8: Resumo dos polimorfismos encontrados no gene SLC4A2 no paciente 3. Seqüência de referência do DNA genômico do gene SLC4A2 (ENSG00000164889) e do transcrito (ENST00000413384) (ENSEMBL). Na região intrônica 3-4 do exon 6, foi encontrado um SNP já relatado com uma substituição A>G. No exon 6, observa-se substituição em heterozigose A>T que não modificou a treonina 210. No exon 8, a substituição em heterozigose T>C também não alterou a treonina 357.

No exon 6, foi observado polimorfismo com substituição silenciosa em heterozigose na terceira base do códon do resíduo 210 (ACA e ACT). Essa substituição não alterou a treonina 210. Essa variação já foi relatada com frequência de 25% a 77% em diferentes

populações (rs2229549). No exon 8 também foi encontrado um polimorfismo já descrito (rs2229550) com uma variação C>T sem alterar a treonina 357. Para essa substituição, tem sido relatada uma frequência de 83% a 97% dependendo da população estudada.

Nenhuma alteração significativa foi encontrada no gene *SLC4A2* excluindo seu envolvimento na etiologia da AI e dos problemas renais desse paciente. Posteriormente, com novos exames bioquímicos e avaliação mais criteriosa dos achados anteriores, confirmou-se o diagnóstico de FHHNC e realizou-se a abordagem dos genes candidatos *CLDN16* e *CLDN19*.

Como o paciente não apresentava problemas oculares severos, optou-se por seqüenciar primeiramente, o gene *CLDN16*. No sequenciamento das junções intron-exon e da região codificante do gene *CLDN16*, foi observada uma variação de seqüência em heterozigose no exon 1. Ocorreu a substituição C>G na base 255, resultando na substituição da fenilalanina 85 por uma leucina (F85L). Essa variação foi herdada do pai e o genótipo heterozigoto C/G já foi relatado como um SNV (variação simples de nucleotídeo) com uma prevalência de 0,02% em um estudo populacional na América do Norte (figura 9).

A análise da variação F85L pelo SIFT atribuiu um escore 0.92 e a predição para essa substituição foi de uma alteração tolerada. Na análise pelo Polyphen, foi encontrado o escore 0.246 e a variação foi considerada benigna. Foi realizada a comparação por homologia da seqüência de aminoácidos da claudina-16 do *Homo sapiens* com diferentes espécies de vertebrados e observou-se que a região da fenilalanina 85 é bem conservada (figura 10).

Como a doença é autossômica dominante causada por mutações em homozigose ou heterozigose composta, descartou-se a hipótese de que a causa da doença estivesse ligada a uma única variação de seqüência e a região do promotor do gene foi seqüenciada. Na região do promotor foi encontrado apenas um polimorfismo com substituição T>C, que já foi relatado com uma frequência de 6 a 27% em diversas populações (figura 9).

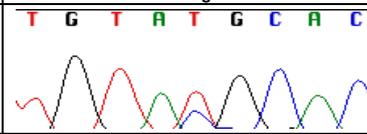
Gene <i>CLDN16</i> (ENSG00000113946)					
Região	Alteração	Códon Resultado	Resultado do sequenciamento Cromatograma	Referência Posição	Frequência
Promotor	c. -1533 T>C	Região do promotorregião		Polimorfismo Rs62278697 3:190104396	6% a 27%
Exon 1	c.255 C>G	TT <u>C</u> >TT <u>G</u> F85L		SNV Rs149116671 3:190106163	0,02%

Figura 9: Variações de sequência encontradas no gene *CLDN16* no paciente 3. Na região do promotor, foi observado apenas um polimorfismo já relatado. No exon 1, a substituição em heterozigose da base 255 substituiu a fenilalanina 85 por uma leucina.

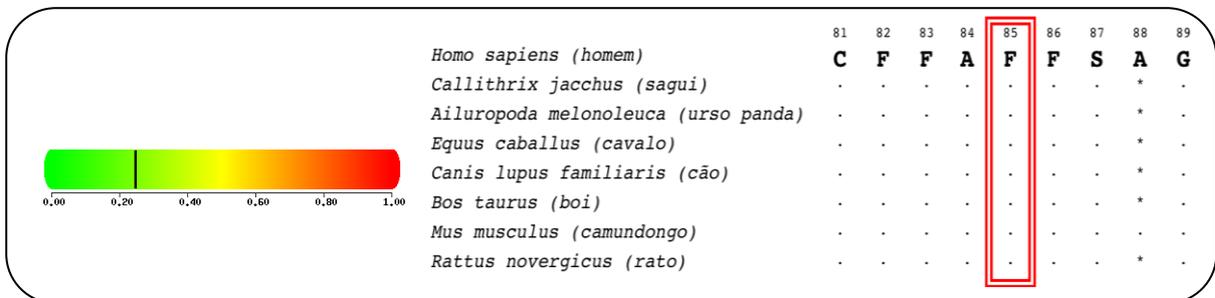


Figura 10: Resultado da análise da substituição F85L na *CLDN16* pelo programa POLYPHEN. Foi atribuído o escore 0.246 considerando a substituição provavelmente benigna. A região da fenilalanina 85 na claudina 16 do *Homo sapiens* é bem conservada em diferentes espécies de vertebrados (.). Área conservada (*) Aminoácido diferente.

No sequenciamento do gene *CLDN19*, foram encontradas duas variações de sequência em heterozigose composta localizadas nos exons 1 e 2. No exon 1, foi observada a substituição G>A na base 59, substituindo a glicina 20 por ácido aspártico (G20D). A mesma variação foi encontrada em heterozigose no pai. No exon 2, ocorreu uma substituição T>G na base 269, resultando na substituição da leucina 90 pela arginina (L90R). Essa variação foi herdada da mãe que também era heterozigota (figura 11).

No sequenciamento dos genes *CLDN16* e *CLDN19* da irmã não afetada (III-2), nenhuma dessas variações de sequência foi encontrada. O paciente apresentou problemas de crescimento até os 15 anos de idade. Porém, no último ano, cresceu 13cm e atingiu altura compatível com a idade.

Gene <i>CLDN19</i> (ENSG00000164007)					
Região	Alteração Tipo	Códon Resultado	Resultado do sequenciamento Cromatograma	Referência Posição	Frequência
Exon 1	c.59 G>A heterozigose	GGC>GAC G20D		Mutação rs 118203979 1: 43205676	Mutação já relatada em homozigose (Konrad <i>et al.</i> , 2006) e heterozigose composta (Faguer <i>et al.</i> , 2010; Haisch <i>et al.</i> , 2011)
Exon 2	c.269 T>G heterozigose	CTG>CAG L90R		Não relatada 1:43204211	Não relatada

Figura 11: Variações de sequência encontradas no gene *CLDN19* no paciente 3. No exon 1, uma mutação que já relatada em homozigose e em heterozigose composta, com substituição da glicina 20 por ácido aspártico e no exon 2, uma alteração ainda não relatada na literatura, com substituição da leucina 90 por arginina.

A análise da variação G20D pelo SIFT deu um escore 0 indicando uma substituição não tolerada e a análise pelo Polyphen deu o escore 0.998 indicando, uma alteração provavelmente nociva à função da proteína. Na análise de homologia da claudina 19 do *Homo sapiens* com diferentes espécies de vertebrados, foi observada uma conservação na região da glicina 20 (figura 12).

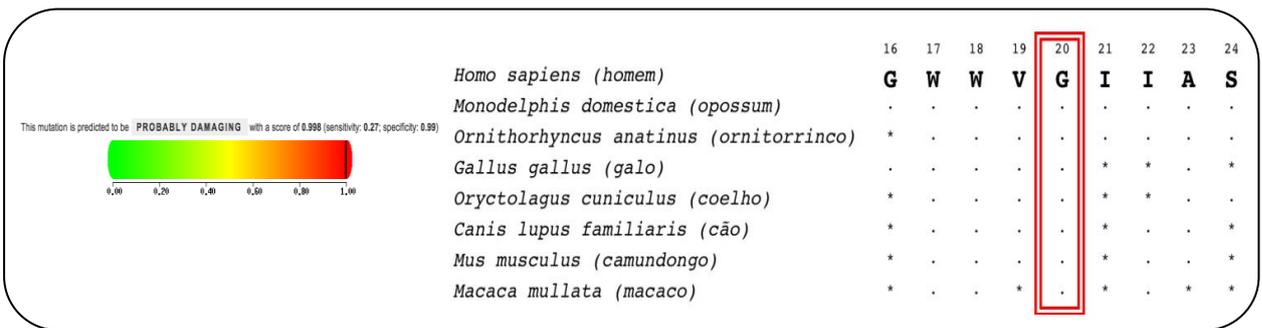


Figura 12: Resultado da análise da substituição G20D no *CLDN19* pelo programa POLYPHEN. Foi atribuído o escore 0.999 considerando a substituição provavelmente nociva. Foi observado um padrão de conservação da região da glicina 20 em diferentes espécies de vertebrados (.) Área conservada (*) Aminoácido diferente.

Para a substituição L90R, a análise pelo SIFT deu um score de 0.01 indicando uma alteração não tolerada e a análise pelo Polyphen deu o escore 0.994 com predição de que essa

alteração seja provavelmente nociva à estrutura e função da proteína. A leucina 90 também é um aminoácido conservado entre diferentes espécies de vertebrados (figura 13).

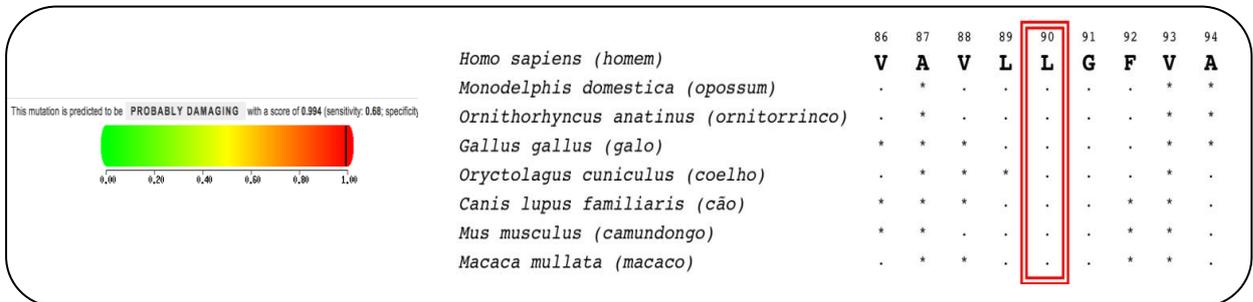


Figura 13: Resultado da análise da substituição L90R no *CLDN19* pelo programa POLYPHEN. Foi atribuído o escore 0.994 considerando a substituição provavelmente nociva. A leucina 90 é um aminoácido conservado entre diferentes espécies de vertebrados (.) Área conservada (*) Aminoácido diferente.

A paciente 4 (III-3) tem atualmente 4 anos de idade. Quando o paciente 3 iniciou o acompanhamento odontológico ela era recém nascida. Ela foi diagnosticada há 2 anos atrás, aos 2 anos de idade. Apresenta nefrocalcinose bilateral, evolui com elevação do PTH (quadro resumo na figura 3) mas apresenta bom estado de saúde geral e sem sinais de perda da função renal (estágio 1).

Ao exame odontológico, apresentou hipoplasia nos caninos decíduos (figura 14). Ainda não foi concluída a análise de variação de sequência dos genes *CLDN16* e *CLDN19* dessa paciente.

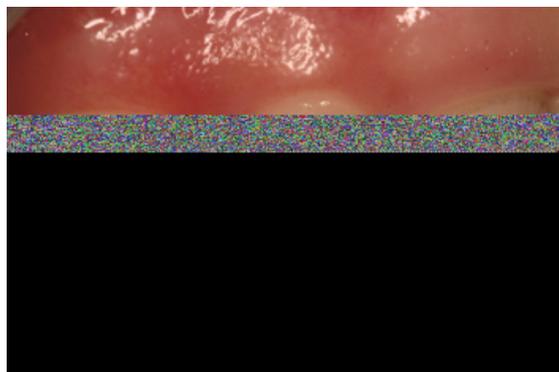


Figura 14: Manifestações bucais da paciente 4. Hipoplasia em caninos decíduos. Alteração de cor do dente por pigmentação extrínseca.

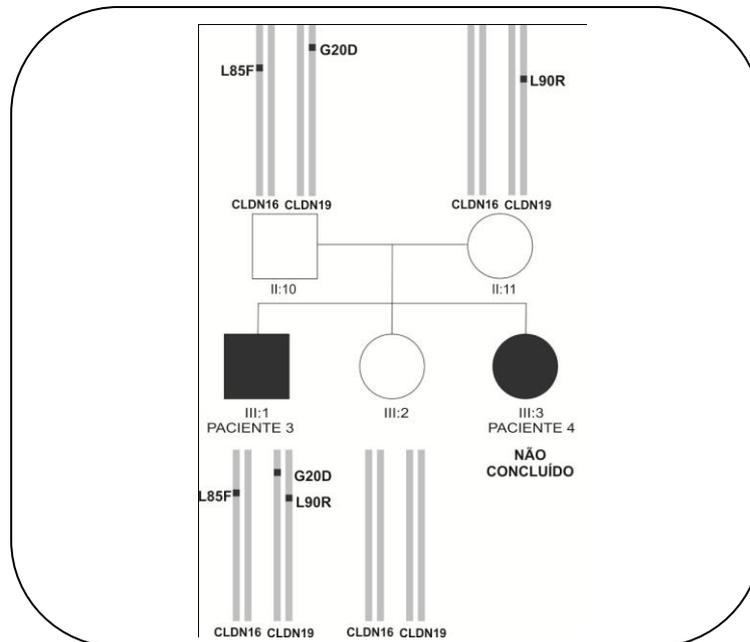


Figura 15: Ilustração das variações de sequência encontradas na família dos pacientes 3 e 4. No gene *CLDN16*, a alteração L85F em heterozigose foi herdada do pai (heterozigoto). No gene *CLDN19*, a alteração G20D em heterozigose foi herdada do pai (heterozigoto) e a alteração L90R, também em heterozigose, foi herdada da mãe (heterozigota). A irmã saudável não apresentou qualquer alteração. A análise da paciente 4 não foi concluída.

5.1.3 Paciente 5:

Paciente do gênero masculino (IV-8), atualmente com 10 anos de idade, é o segundo de quatro filhos de pais não consangüíneos (figura 16).

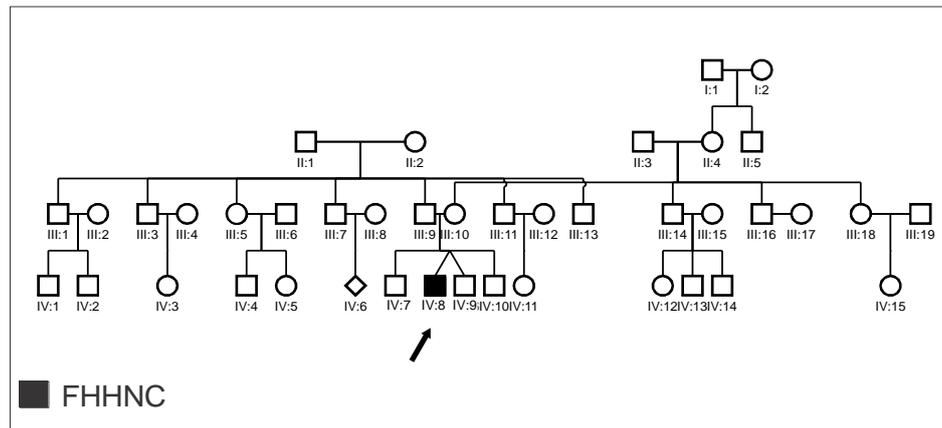


Figura 16: Heredograma da família do paciente 5. Não há história de consangüinidade. Não há outros membros na família afetados.

O paciente foi diagnosticado com FHHNC desde os 3 meses de idade. Na época do diagnóstico, apresentava poliúria, polidipsia e dores abdominais freqüentes. Apresenta comprometimento da função renal com apenas 30% da função (grau 3) e atraso no crescimento pôndero-estatural. Não apresenta alterações visuais ou auditivas.

O irmão mais velho (IV:7), com 13 anos de idade, apresenta uma má formação congênita (rim em ferradura) e o irmão mais novo (IV:10), com 6 anos de idade apresenta elevadas taxas de ácido úrico. Além disso, o paciente tem um irmão gêmeo bivitelino (IV-9), sem qualquer sintomatologia.

Na família, foram relatados alguns outros membros com alterações renais que não foram objeto de estudo nesse trabalho. A história familiar revelou casos de nefrolitíase em todos os tios da família paterna. De acordo com relatos, um primo da família materna (IV:14) apresenta má-formação renal, um tio paterno (III:13) apresenta nefrolitíase e paralisias temporárias, e o tio avô materno (II:5) possui rim hipoplásico e história de defeitos de

desenvolvimento do esmalte dentário (atualmente faz uso de prótese total). Esses dados foram obtidos por relatos mas não foram confirmados.

No 10º mês de vida, a calcemia e magnesemia decresceram significativamente e o paciente apresentou convulsões, pneumonia e anóxia cerebral. Atualmente, os níveis de PTH e ácido úrico estão elevados. O paciente faz uso de quelato de magnésio, citrato de potássio e hidroclorotiazida.

Foram observados defeitos hipoplásicos em caninos decíduos e hipoplasia severa em todos os dentes permanentes (Figura 17). O tecido gengival apresentou aspecto normal, e ao exame radiográfico não foram observadas alterações radiculares, esqueléticas ou calcificações intrapulpares. A cronologia de erupção também estava normal.

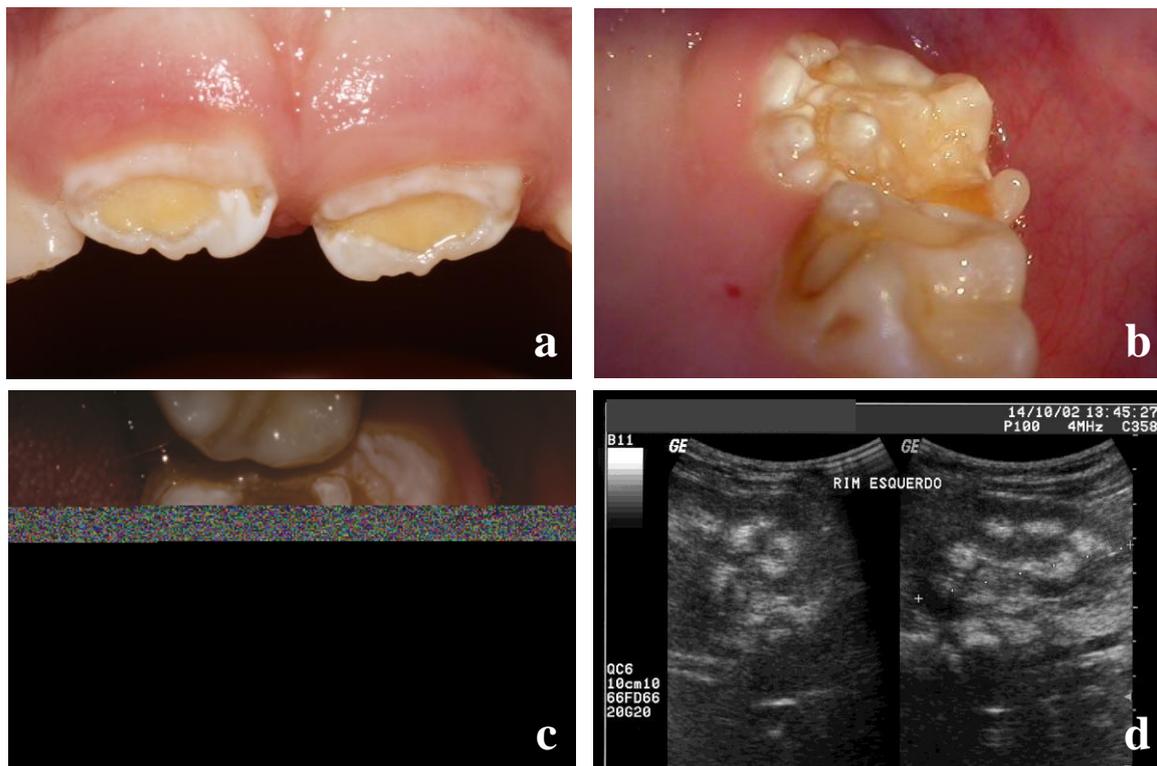


Figura 17: Manifestações bucais do paciente 5 e imagem de ultrassonografia. Hipoplasias severas no esmalte dos incisivos e molares com áreas com completa ausência de esmalte (figuras a-c). Exame de ultrassonografia evidenciando as imagens ecogênicas sugestivas de nefrocalcinose (Figura d)

Na análise de variação de sequência, como o paciente não apresentava alterações visuais, o *CLDN16* foi considerado o principal gene candidato. No sequenciamento do gene *CLDN16*, foi encontrada uma substituição em heterozigose na base 255 do exon 1 (C>G), resultando na substituição da fenilalanina 85 por uma leucina (F85L). Essa variação não foi encontrada nos pais nem no irmão saudável, sugerindo ser uma alteração *de novo*. Essa variação foi considerada tolerada e benigna pelos programas SIFT e POLYPHEN. A comparação entre as espécies demonstrou ser uma região conservada. Essa alteração foi a mesma encontrada no paciente 3 (resultados das análises já ilustrado anteriormente na figura 10).

Como só foi encontrada essa alteração no sequenciamento do gene *CLDN16*, a região do promotor do gene também foi sequenciada e foram encontradas duas variações de sequência já relatadas como SNP's com frequência variada dependendo da população estudada (figura 18).

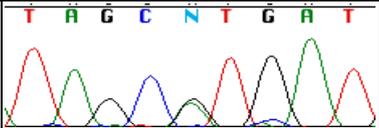
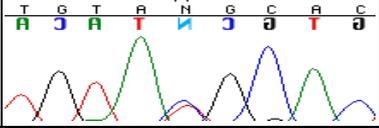
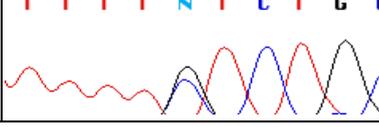
Gene <i>CLDN16</i>					
Região	Alteração Tipo	Códon Resultado	Resultado do sequenciamento Cromatograma	Referência Posição	Frequência
Promotor	c. -1606 G>A	Região do promotor		Rs6764454 3:190104303	14% a 29%
Promotor	c. -1533 T>C	Região do promotor		Rs62278697 3:190104376	6% a 27%
Exon 1	c.255 C>G	TT <u>C</u> >TT <u>G</u> F85L		SNV Rs149110071 3:190106163	0,02%

Figura 18: Variações de sequência encontradas no gene *CLDN16* no paciente 5. Na região do promotor, foram observados dois SNP's já relatados. No exon 1, a substituição em heterozigose da base 255 afetou a fenilalanina 85, codificando uma leucina. Essa variação foi reportada como um SNV.

Em seguida, foi realizado o sequenciamento do gene *CLDN19*. Foram encontradas três variações de sequência em heterozigose nos exons 1, 3 e 4. No exon 1, foi observada uma

substituição na base 59 (G>A), substituindo a glicina 20 por ácido aspártico (G20D) (figura 20). Esse alelo foi herdado da mãe que também era heterozigota para essa variação de sequência. Essa alteração foi a mesma encontrada no paciente 3 e todas as análises pelo SIFT e Polyphen são idênticas às já descritas (figura 12).

No exon 3, foi encontrada uma mutação silenciosa com substituição de base C>T, sem ocorrer modificação da serina 152. No exon 4, ocorreu uma substituição da base 599 (G>A), resultando na substituição da arginina 200 por uma glutamina (R>Q). Essa alteração já foi relatada como um SNV em menos de 1% da população. Essa variação não foi encontrada nos pais nem no irmão gêmeo, sugerindo uma alteração *de novo* (figuras 19 e 21).

A análise pelo SIFT da substituição R200Q indicou ser uma alteração tolerada com escore de 0.61 e a análise pelo Polyphen atribuiu um escore 0.023 com predição de ser uma alteração benigna. No pareamento por homologia da claudina-19 do *Homo sapiens* com outras espécies de vertebrados, observou-se que a região da arginina 200 não é uma região conservada (figura 20).

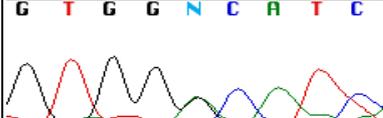
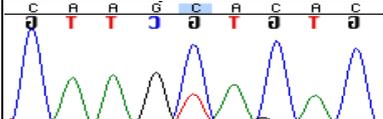
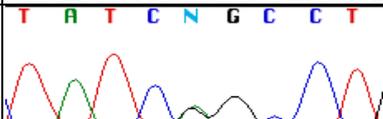
Gene <i>CLDN19</i> (ENSG00000164007)					
Região	Polimorfismo	Códon Resultado	Resultado do sequenciamento Cromatograma	Referência Posição	Frequência
Exon 1	c.59 G>A heterozigose	GGC>GAC G20D		Mutação rs 118203979 1: 43205676	Mutação já relatada em homozigose (Konrad <i>et al</i> , 2006) e heterozigose (Faguer <i>et al</i> , 2010; Haisch <i>et al</i> , 2011)
Exon 3	c.456 C>T heterozigose	AGC>AGT S152S (sinônima)		Não relatada 1:43203895	Não relatada
Exon 4	c.599 G>A heterozigose	CAG>CAG R200Q		SNV rs116804195 1:43201576	<1%

Figura 19 – Variações de sequência encontradas no gene *CLDN19* no paciente 5. No exon 1, a da base 59 (G>A), provocou a substituição da glicina 20 por ácido aspártico. No exon 3, foi encontrada uma mutação sinônima e no exon 4, ocorreu uma substituição da base 599 (G>A), resultando na substituição da arginina 200 por uma glutamina.

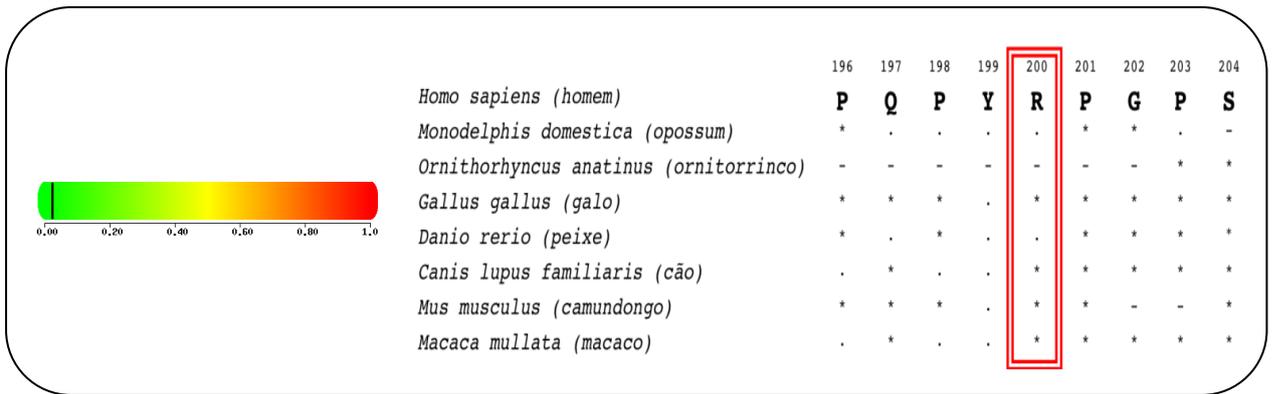


Figura 20 - Resultado da análise da substituição R200Q no CLDN19 pelo programa POLYPHEN. Foi atribuído o escore 0.023 considerando benigna a substituição R200Q. A arginina 200 é um aminoácido pouco conservado entre diferentes espécies de vertebrados (.) Área conservada (*) Aminoácido diferente.

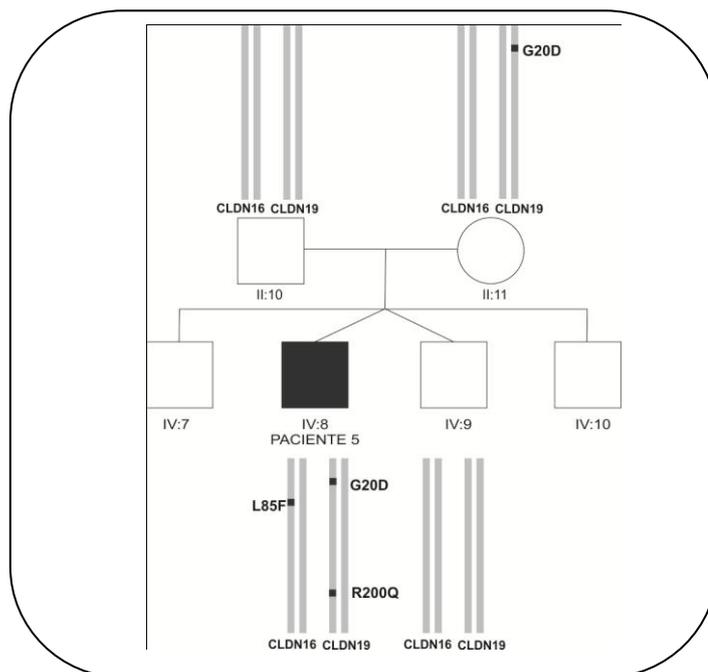


Figura 21: Ilustração das variações de sequência encontradas na família do paciente 5. No gene *CLDN16*, a variação L85F em heterozigose não foi encontrada nos pais (alteração *de novo*). No gene *CLDN19*, a alteração G20D em heterozigose foi herdada da mãe e a variação R200Q também não foi observada nos pais (*de novo*). O irmão gêmeo bivitelo e saudável não apresentou qualquer alteração. A ilustração sugere que a alteração G20D e R200Q estejam no mesmo alelo, mas isso ainda não foi comprovado.

5.1.4 Paciente 6:

Paciente do gênero feminino (figura 22 - III:4), filha de pais consangüíneos em primeiro grau, foi diagnosticada com FHHNC tardiamente aos 20 anos de idade. Os primeiros sinais e sintomas se iniciaram aos 18 anos de idade. A paciente apresentou sintomas de hipocalcemia e os exames bioquímicos revelaram PTH elevado, hiperuricemia e dislipidemia. Aos 20 anos, novos exames revelaram hipomagnesemia, hipercalciúria e nefrocalcinose. Evolui com comprometimento moderado da função renal (estágio 3) mas encontra-se estável no momento. A densitometria óssea revelou osteoporose na cabeça do fêmur. Não apresenta alterações auditivas e apresenta miopia leve (quadro com resumo das alterações na figura 3).

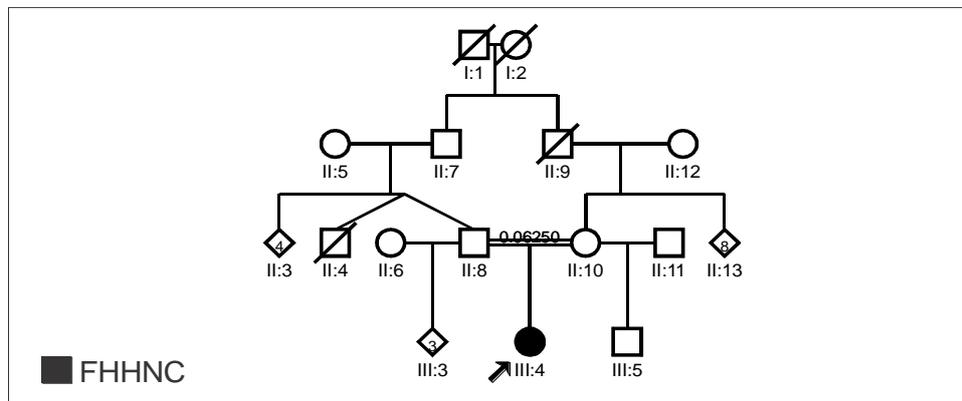


Figura 22: Heredograma da família da paciente 6. Pais primos em primeiro grau. Sem outros membros afetados na família.

Ao exame intrabucal, observou-se que os dentes permanentes apresentaram opacidades difusas, com áreas de opacidades restritas e perda de estrutura provavelmente decorrente de desgaste dentário por atrição. O tecido gengival apresentou aspecto normal (figura 23). Ao exame radiográfico não foram observadas alterações radiculares ou calcificações intrapulpares.



Figura 23 - Manifestações bucais da paciente 6. Opacidades difusas com áreas de opacidades restritas e difusas em toda a dentição permanente.

O seqüenciamento do gene *CLDN16* se limitou à região do promotor e do exon 1 pois não foi possível se amplificar os exons 2, 3, 4 e 5 na reação de PCR, indicando uma possível deleção do gene. O seqüenciamento da região promotora do gene *CLDN16* não revelou qualquer alteração de seqüência e também não foi detectada qualquer alteração no exon 1.

As regiões codificantes e junções intron-exon do gene *CLDN19* foram completamente seqüenciadas. O *CLDN19* não apresentou qualquer variação de seqüência.

5.2 Pacientes com ATRd e nefrocalcinose

Os pacientes 7, 8 e 9 apresentaram ATRd com NC. Os pacientes 7 e 8 apresentaram surdez neurosensorial e o paciente 9 apresentou audição normal.

5.2.1 Paciente 7:

Paciente do gênero feminino, 17 anos de idade, filha mais nova de três filhos de pais não consangüíneos e saudáveis. O diagnóstico de nefrocalcinose e ATRd foi realizado aos 6 meses de idade após episódio de anemia e pneumonia recorrente. Desde então, vem sendo tratada com bicarbonato de sódio e citrato de potássio. Apresenta função renal preservada e evolui sem outras alterações. Os dois irmãos mais velhos são saudáveis. Aos 8 anos de idade, foi diagnosticada surdez neurosensorial e a paciente iniciou a utilização de aparelho auditivo. A paciente também apresenta miopia leve.

Ao primeiro exame odontológico, a paciente apresentou caninos e segundos molares decíduos com hipoplasias e opacidades difusas. Na dentição permanente, os incisivos centrais permanentes superiores e inferiores apresentaram pequenos pontos hipoplásicos (figura 24). Os outros dentes apresentaram esmalte normal. O tecido gengival apresentou aspecto normal e a cronologia de erupção não apresentou alterações. Não foram detectadas calcificações pulpares ao exame radiográfico. Nenhum dos irmãos apresentou manifestações bucais semelhantes.

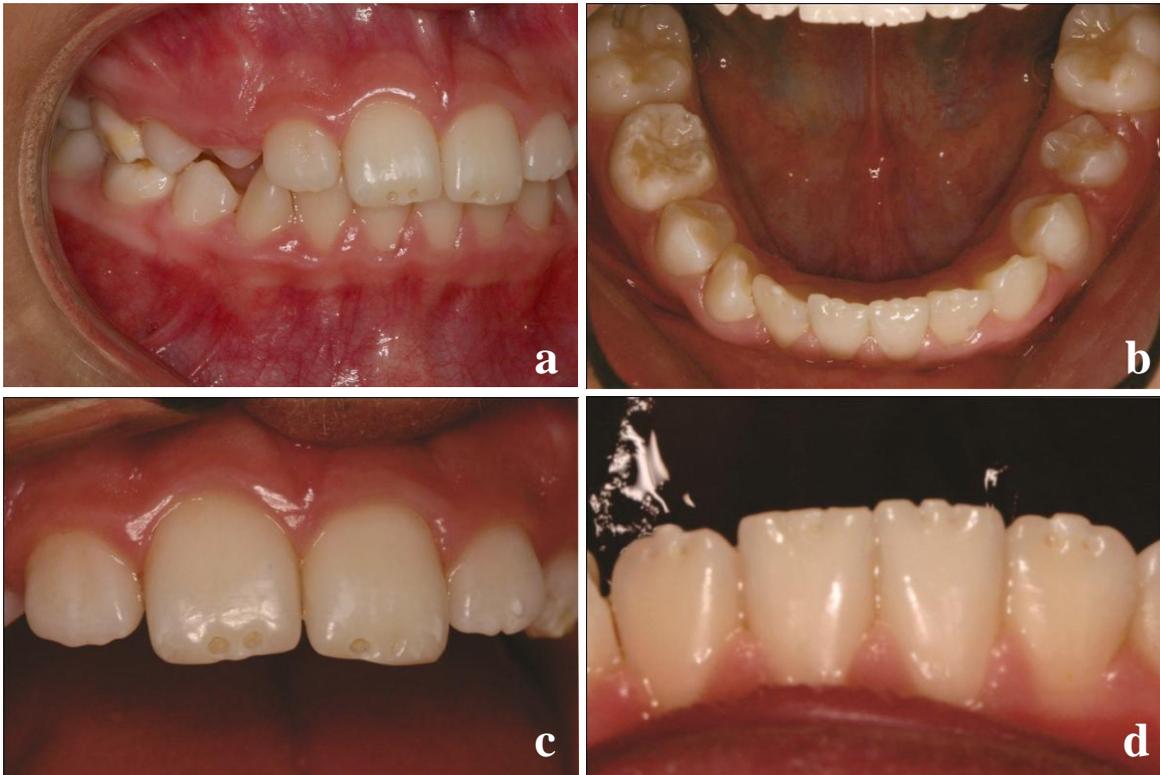


Figura 24 – Manifestações bucais do paciente 7. Nos molares decíduos foram observadas opacidades e pontos hipoplásicos. Os incisivos permanentes apresentaram hipoplasias em forma de pontos na região incisal dos incisivos centrais superiores e incisivos centrais e laterais inferiores.

5.2.2 Paciente 8:

Paciente do gênero masculino (V:1), 17 anos de idade, filho de pais primos em terceiro grau. Único membro da família afetado (figura 25).

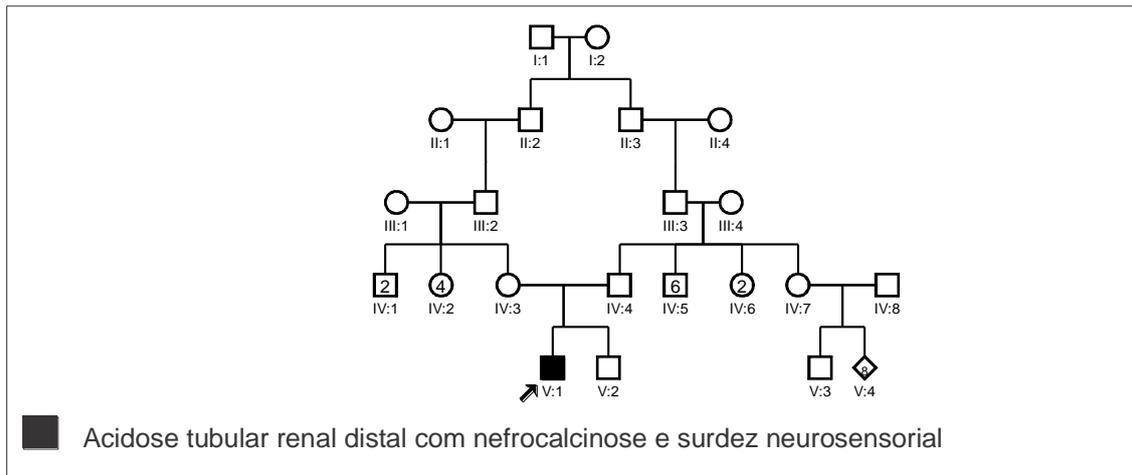


Figura 25: Heredograma da família do paciente 8. Os pais são primos em terceiro grau e não há outros membros da família afetados.

Desde o terceiro mês de vida, o paciente apresentou dificuldade de ganho de peso e foi tratado como se fosse portador de desnutrição crônica. Aos 5 anos de idade, foi diagnosticada surdez neurosensorial e o paciente passou a utilizar aparelho auditivo.

Aos 8 anos de idade, após episódios de tetania e atraso no crescimento pândero-estatural, exames bioquímicos revelaram acidose metabólica hiperclorêmica, hipocalemia, hipocalcemia e osteopenia. Ao exame de ultrassonografia, foi detectada nefrocalcinose mas a função renal estava preservada. O paciente foi diagnosticado com ATRd e nefrocalcinose com surdez neurosensorial.

Atualmente, o paciente faz uso de citrato de potássio, bicarbonato de sódio e cloreto de potássio e evolui sem complicações. A família relata que um primo (V:3) também tem problemas renais mas não souberam fornecer detalhes.

Ao exame odontológico, foi observada cronologia de erupção normal, porém os dentes apresentavam-se com descoloração amarelada e hipoplasias generalizadas na forma de pontos (figura 26). Muitos dentes já tinham recebido prévio tratamento restaurador. Apesar de apresentar muitos defeitos em esmalte, o paciente não apresentava lesões cariosas. O tecido gengival apresentava-se saudável, e não foram observadas calcificações intra-pulpaes. A avaliação oftalmológica não detectou alterações.



Figura 26: Manifestações bucais do paciente 8. Descoloração amarelada com hipoplasias severas na forma de pontos.

5.2.3 Paciente 9:

Paciente do gênero masculino com 29 anos de idade, filho único de pais não consangüíneos. Foi diagnosticado aos 4 de idade com ATRd e nefrocalcinose bilateral. Apresenta retardo mental. Atualmente, sua função renal está levemente comprometida (68,7 mL/min/1,73m²), e apresenta hiperuricemia, proteinúria, PTH levemente reduzido, acidose metabólica controlada com bicarbonato de sódio.

Ao exame intrabucal, foi observada maloclusão do tipo classe III, gengiva com aspecto normal com leve inflamação em regiões com acúmulo de biofilme bacteriano, opacidade difusa no terço incisal e médio de toda a dentição permanente, conferindo um aspecto esbranquiçado aos dentes, pequenos pontos hipoplásicos na face vestibular do incisivo central esquerdo e lateral direito, e hipoplasia no terço médio dos caninos (figura 27). Ao exame radiográfico, não foram observados cálculos intrapulpares.



Figura 27: Manifestações bucais do paciente 9. Opacidade difusa em toda a dentição permanente. Pequenos pontos hipoplásicos na face vestibular dos dente 21 e 41, depressão hipoplásica nos caninos. Prognatismo mandibular com maloclusão.

5.3 Paciente com deficiência da anidrase carbônica II e osteopetrose com nefrocalcinose

5.3.1 Paciente 10

Paciente do gênero feminino com 15 anos de idade, filha única de pais não consanguíneos. Foi diagnosticada logo após o nascimento. Apresenta calcificações cerebrais com retardo mental, osteopetrose, nefrocalcinose e acidose tubular renal distal. Ao exame oftalmológico, foi diagnosticado estrabismo e fotossensibilidade. Possui deficiência auditiva do tipo condutiva com surdez total do lado esquerdo e parcial do lado direito.

As manifestações bucais incluíram maloclusão, mordida aberta anterior, palato profundo, retenção de dentes decíduos, atraso na cronologia de erupção dentária, dentes permanentes retidos, AI do tipo hipoplásica com pontos e depressões afetando dentes decíduos e permanentes. A gengiva apresentou aspecto normal (figura 28).

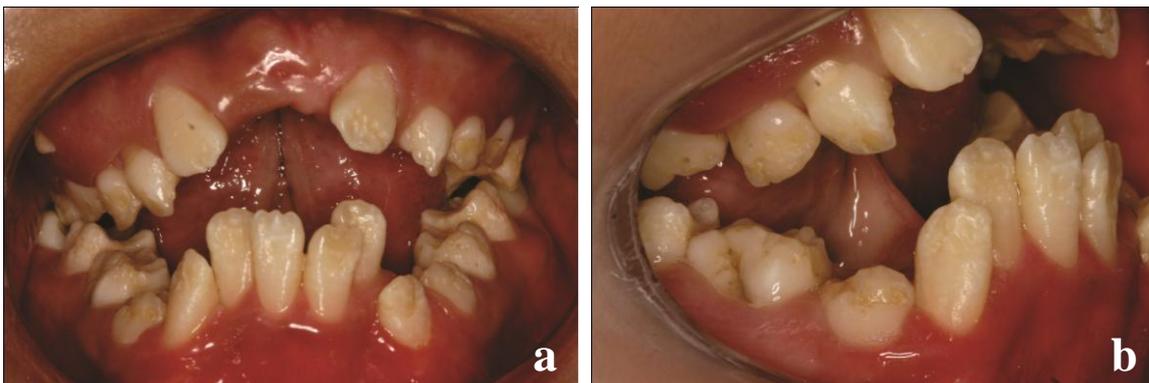


Figura 28: Manifestações bucais da paciente 10. Mordida aberta anterior. Alteração na cronologia de erupção dentária com retenção de dentes decíduos. Hipoplasias na dentição decídua e na dentição permanente.

6 DISCUSSÃO

O objetivo geral desse trabalho foi descrever as manifestações bucais de pacientes com algum tipo de doença renal hereditária e nefrocalcinose. Assim, todos os pacientes que preenchiam os critérios de inclusão atendidos em três unidades públicas de serviço da área metropolitana de Brasília foram encaminhados para a avaliação odontológica. O estudo incluiu um total de 10 pacientes e seus familiares diretos com 3 tipos de doenças: FHHNC, ATRd com e sem surdez e deficiência da ACII com ATRd e osteopetrose. O pequeno tamanho da amostra pode ser explicado pela raridade da doença, por uma sub-notificação dos casos, ou pela baixa procura por tratamento na rede pública de assistência. Porém, não há dados epidemiológicos que indiquem a prevalência dessas doenças no Distrito Federal.

Esse estudo relata pela primeira vez, as manifestações bucais de um grupo maior de pacientes com FHHNC e com ATRd e nefrocalcinose. Além disso, contribui com mais um relato de caso de uma paciente com deficiência da ACII, osteopetrose e nefrocalcinose. Em graus variados de tipo e severidade, todos os pacientes apresentaram defeitos de desenvolvimento do esmalte. Devido à complexidade dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na amelogênese e à diversidade de fatores que podem interferir nesse processo, não foi objetivo desse estudo definir a etiologia dos defeitos. A análise de variação de sequência com abordagem de genes candidatos que foi realizada nos pacientes com FHHNC que apresentaram fenótipo de AI teve, como objetivo, definir o diagnóstico da FHHNC para direcionar investigações futuras sobre a etiologia dos defeitos de esmalte nesses pacientes.

Nenhum dos pacientes com FHHNC desse estudo apresentou o fenótipo descrito por Cetrullo *et al* (2006) e apenas uma paciente com ATRd apresentou o mesmo fenótipo descrito por Elizabeth *et al* (2007). A paciente com deficiência da ACII apresentou fenótipo semelhante ao previamente descrito por Ismail *et al* (1997).

Em pacientes com FHHNC e HOMG5, vários trabalhos têm descrito as manifestações clínicas e realizado a análise de mutação, mas até o momento, apenas um estudo descreveu as manifestações bucais encontradas em duas irmãs chinesas com FHHNC. A análise de mutação não foi realizada e o diagnóstico foi essencialmente clínico. Elas foram diagnosticadas aos 14 e 18 anos de idade e apresentaram maloclusão tipo III de Angle, mordida aberta anterior, mordida cruzada posterior, hipoplasias severas no esmalte, descoloração amarelada, gengivite, e periodontite agressiva (Cetrullo *et al*, 2006). Nenhum dos seis pacientes desse estudo apresentou doença periodontal, mordida aberta anterior, ou maloclusão tipo III, indicando que essas alterações não fazem parte do fenótipo da doença e podem estar relacionadas a outros fatores, como a etnia dos pacientes, por exemplo. Não se pode excluir a possibilidade de as manifestações serem dependentes do local e da proteína mutada. Seria importante a realização de um estudo clínico de correlação fenótipo-genótipo.

Ainda não há estudos que demonstrem o efeito tanto da hipomagnesemia como da hipercalcúria sobre a amelogênese. Estudos prévios já identificaram ATPases de cálcio e magnésio na membrana de ameloblastos durante a fase de maturação e concluíram que elas tinham papel no mecanismo ativo de aporte de cálcio até a frente de mineralização (Salama *et al*, 1987; Salama *et al*, 1989). O magnésio é um cátion essencial para diversas funções celulares, mas ainda não se sabe se ele é um mineral importante para a composição do esmalte.

Diversos trabalhos demonstram que quadros persistentes de hipocalcemia induzem a hipoplasias de esmalte (Sarnat & Moss, 1985; Lozupone & Favia, 1989; Limeback *et al*, 1992; Bonucci *et al*, 1994; Acevedo *et al*, 1996; Chardin *et al*, 1998; Nanci *et al*, 2000; Acevedo *et al*, 2002; Yamaguti *et al*, 2005), mas nenhum paciente desse estudo apresentou hipocalcemia persistente. As pacientes 4 e 6 apresentaram hipocalcemia quando

diagnosticadas que foi corrigida com a medicação. Além disso, o aumento do PTH nesses pacientes mantém o nível do cálcio sérico constante.

Sabe-se que nesses pacientes, a resposta ao tratamento ainda é um desafio. Apesar de medicados, os pacientes não conseguem manter a magneemia e controlar a perda de cálcio. A hipercalcúria costuma diminuir com o tratamento com tiazídicos, mas isso não parece atenuar a progressão para perda da função renal e o aumento do PTH (Kari *et al*, 2003). A resposta à suplementação com magnésio pode ser positiva, e tende a diminuir com a progressão para a perda da função renal (Zimmermann *et al*, 2006). Mas em alguns casos, ela pode apenas diminuir a velocidade da progressão da doença (Kari *et al*, 2003). Em geral, esses pacientes entram em insuficiência renal crônica ainda na adolescência.

Em crianças com insuficiência renal crônica, uma maior prevalência de pequenos defeitos de desenvolvimento do esmalte e até hipoplasias severas têm sido relatada (Nunn *et al*, 2000; Al-Nowaiser *et al*, 2003). Porém, um estudo com 30 crianças e adolescentes brasileiros não observou essa associação (Martins *et al*, 2008). Apesar da causa dos defeitos serem atribuídas ao distúrbio de cálcio e fosfato e à desnutrição nesses pacientes, a grande variedade de patologias renais que podem estar associadas à progressão para a insuficiência renal crônica em crianças dificulta a discussão dos resultados desses estudos. Descrições mais detalhadas são necessárias para se tentar definir a etiologia dos defeitos de esmalte em pacientes com doenças renais crônicas.

Nesse estudo, com exceção da paciente 4, todos os pacientes já apresentavam perda da função renal quando diagnosticados, mas os defeitos foram bastante heterogêneos, não sendo possível estabelecer correlação de causa e efeito entre o grau de severidade, a idade do diagnóstico, os achados bioquímicos e o grau de comprometimento da função renal. Os defeitos mais severos foram observados no paciente 3, que foi diagnosticado e tratado depois

dos 8 anos de idade, e no paciente 5, que foi diagnosticado e tratado desde os 3 meses de idade.

Esses achados sugerem que a etiologia dos defeitos de desenvolvimento do esmalte nos pacientes com FHHNC não esteja ligada somente aos distúrbios de homeostase sistêmicos e tenha um mecanismo molecular diretamente envolvido na patogênese da doença. Sabe-se que diferentes isoformas da claudina estão expressas nos ameloblastos durante a amelogênese (João & Arana-Chavez, 2004; Bello *et al*, 2007; Inai *et al*, 2008; Hata *et al*, 2010), mas as isoformas 16 e 19 ainda não foram identificadas. Estudos de imunolocalização dessas proteínas em ameloblastos poderão contribuir para melhor entendimento sobre a etiologia dos defeitos de desenvolvimento do esmalte encontrados em pacientes com FHHNC.

Nesse estudo, os pacientes 1 e 2 também apresentaram diabetes tipo I. A associação de diabetes tipo I com FHHNC nunca foi relatada na literatura. Ela pode não estar relacionada à FHHNC, mas precisa ser melhor investigada. Ambos foram tardiamente diagnosticados quando o esmalte de quase todos os dentes permanentes já estava formado. Porém, esses pacientes apresentaram os menores defeitos, incluindo apenas leves opacidades difusas e restritas sem relação cronológica. Não há dados sobre o período em que se iniciou o comprometimento renal, mas desde a época do diagnóstico aos 9 e 7 anos de idade foi constatado comprometimento leve estágio 2. Esses pacientes ainda não foram submetidos à análise de variação de sequência.

A manifestação de um fenótipo de AI hipomaturada e hipoplásica severa no paciente 3 estimulou a busca pela identificação do fator etiológico. Como seu diagnóstico inicial não estava definido e estudos experimentais já haviam relatado a associação de hipoplasia e hipomaturação de esmalte em animais transgênicos para a AE2 (Lyyruu *et al*, 2008; Paine *et al*, 2008), o gene SLC4A2 foi seqüenciado. Como só foram encontrados dois SNP's com

mutação sinônima na região codificante e um SNP na junção intron-exon, seu envolvimento na patogênese da doença foi descartado.

No gene *CLDN16*, foi encontrada a substituição da fenilalanina 85 por uma leucina (F85L). A fenilalanina 85 se localiza no primeiro domínio transmembrana da claudina-16 e essa alteração já foi relatada como um SNV aparentemente tolerado e benigno. A substituição desse aminoácido aromático por um aminoácido alifático e apolar não parece ser prejudicial, mas quando a claudina-16 de diferentes espécies de vertebrados são pareadas, é observado um padrão de conservação nessa região.

No gene *CLDN19*, foram encontradas mais duas variações: uma herdada do pai no exon 1 (G20D), e outra herdada da mãe no exon 2 (L90R). A alteração encontrada na glicina 20, com substituição por asparagina já foi relatada em pacientes afetados tanto em homozigose (Konrad *et al*, 2006; Faguer *et al*, 2010) como em heterozigose composta em famílias com ascendência europeia (Faguer *et al*, 2010; Haisch *et al*, 2011). Faguer *et al* (2010) relataram a heterozigose composta G20D e V44M e Haisch *et al* (2011) relataram a associação G20D e P28L.

A glicina 20 da claudina-19 é um aminoácido conservado entre as espécies. Além disso, a substituição de um resíduo alifático apolar por um resíduo carregado negativamente pode alterar drasticamente a conformação protéica. Um estudo funcional em cultura celular demonstrou que a claudina-19 mutante G20D fica retida no citoplasma na região perinuclear e não é exportada para a membrana (Konrad *et al*, 2006).

A segunda variação com a substituição da leucina 90 por uma arginina (L90R) nunca foi relatada. A leucina 90 se localiza no segundo domínio transmembrana em uma região muito conservada na claudina-19 de diferentes espécies. Nesse mesmo aminoácido, um estudo relatou substituição da leucina 90 por uma prolina (L90P) em homozigose e a reconstrução tridimensional computadorizada indicou que essa alteração poderia afetar toda a

estrutura secundária da proteína rompendo a região das α -hélices (Konrad *et al*, 2006). No presente estudo, ocorreu a substituição da leucina por uma arginina, trocando um grupo alifático apolar por um grupo carregado negativamente. Outros estudos são necessários para verificar o efeito do acúmulo da substituição em heterozigose F85L, no gene *CLDN16*, com as substituições L90R e G20D, no gene *CLDN19*. Ainda não há relatos de mutações em heterozigose envolvendo o gene *CLDN16* e *CLDN19* simultaneamente. A irmã saudável não apresentou qualquer dessas variações.

A irmã afetada do paciente 3, paciente 4, apresentava hipocalcemia quando foi diagnosticada. Porém, como ela ainda está na dentição decídua, foram observados apenas pequenos defeitos hipoplásicos nos caninos. Em geral, os dentes decíduos de pacientes com distúrbios renais são pouco afetados porque o esmalte desses dentes é formado ainda no período embrionário e a nutrição fetal é provida pela placenta com o suprimento sanguíneo materno (Koch *et al*, 1999; Nunn *et al*, 2000). Os defeitos mais frequentemente observados em dentes decíduos são, de fato, nos caninos, em virtude do término de sua amelogênese ocorrer no período pós-natal (Koch *et al*, 1999). A reavaliação da dentição permanente poderá fornecer informações mais relevantes. Além disso, ressalta-se a importância da intervenção médica para tentar realizar compensação nutricional e controle da homeostase de eletrólitos e prevenir defeitos na dentição permanente. A análise de variação de sequência dessa paciente não foi concluída.

O paciente 5 apresentou um fenótipo de AI hipoplásica severa. Nesse paciente também foi encontrada a substituição F85L na claudina-16 e a variação G20D na claudina-19. Além disso, ele apresentou uma substituição na arginina 200 da claudina-19 por glutamina (R200Q). As variações F85L e G20D já foram discutidas anteriormente e a variação R200Q já foi relatada como uma SNV com frequência inferior a 1%. Tanto a variação F85L como a R200Q não foram observadas nos pais, sugerindo que sejam duas variações *de novo*.

A arginina 200 está localizada na região citoplasmática da claudina-19. A análise pelo SIFT e Polyphen indicaram que a substituição seja tolerada e benigna, pois a região não é conservada entre as espécies, mas a substituição de um aminoácido carregado positivamente por um aminoácido polar pode provocar alguma alteração quando somada a outras substituições. Outros estudos serão necessários para determinar o efeito somatório de todas essas variações de sequência. A mãe, heterozigota para G20D não apresentou qualquer manifestação clínica e o irmão saudável, não apresentou qualquer variação.

Na família do paciente 5 foram relatados outros membros com problemas renais. Na família paterna, com exceção dos pais, todos os tios apresentavam nefrolitíase, mas não foi encontrada qualquer variação no *CLDN16* e *CLDN19* do pai. Um tio avô materno apresenta defeitos de formação renal e relata defeitos de desenvolvimento do esmalte, mas esses familiares não foram estudados nesse trabalho. Uma avaliação mais detalhada após a comprovação da etiologia da doença no paciente 5 deverá ser realizada.

A paciente 6 foi tardiamente diagnosticada aos 20 anos de idade já com 50% de perda da função renal e com um quadro de hipocalcemia e osteoporose, porém apresentou apenas opacidades difusas e restritas e um fenótipo semelhante à AI hipomaturada. Na análise de variação de sequência, só foi possível sequenciar o exon 1 do gene *CLDN16*. A partir do exon 2 até o exon 5, não foi possível realizar a reação de PCR sugerindo uma deleção gênica. Nenhuma alteração foi encontrada no gene *CLDN19*. Devido à suspeita de deleção no *CLDN16*, o DNA genômico da paciente e dos pais será submetido a uma análise com outra técnica para detecção de possível deleção dos exons 2 a 5. É importante ressaltar que a paciente é filha de pais consangüíneos em primeiro grau. Outros estudos serão necessários para determinar se ocorreu, e onde se iniciou a deleção.

O fenótipo renal de camundongos nocauteados para a claudina-16 é semelhante ao exibido por pacientes com mutações no *CLDN16*, mas o fenótipo dentário também não tem

sido descrito (Himmerkus *et al*, 2008; Shan *et al*, 2009). Em gados mutantes com deleção de parte do gene *CLDN16*, os animais apresentam perda da função renal precoce e histologicamente, as células dos túbulos renais apresentam-se desorganizadas (Ohba *et al*, 2000). Os autores sugerem que a claudina-16 tenham um papel adicional na organização do epitélio tubular, o que explicaria a evolução para perda precoce da função renal, mas isso ainda não foi comprovado em humanos.

As variações de sequência com substituição de aminoácidos podem ocorrer mesmo sem alterações clínicas significativas. Estima-se que cada pessoa seja heterozigota para cerca de 24000 a 40000 substituições de aminoácidos e que mais de 50% das doenças genéticas mendelianas sejam transmitidas por variações de sequência com substituição do aminoácido (Cargill *et al*, 1999). O efeito de todas as substituições encontradas nesse estudo, com exceção da G20D, que já foi confirmada por meio de estudos funcionais, deverá ser confirmado. Além disso, é importante avaliar indivíduos controle saudáveis brasileiros para se verificar a frequência dessas alterações nessa população e confirmar a associação dessas substituições com a etiologia da doença.

Todos os pacientes com ATRd e nefrocalcinose do presente estudo também apresentaram defeitos de desenvolvimento do esmalte em diferentes graus de severidade e tipo. Aparentemente, a severidade dos defeitos se correlacionou com o controle da acidose metabólica. Os dois pacientes (pacientes 7 e 9) que foram diagnosticados logo depois do nascimento e tratados com citrato e bicarbonato para prevenir a evolução da nefrocalcinose e para corrigir a acidez metabólica, apresentaram os menores defeitos. No paciente 9, também foi observado retardo mental e maloclusão classe III, mas não foi possível verificar se havia alguma relação com a doença. Até o momento, não há relatos na literatura.

O paciente 8, diagnosticado mais tardiamente aos 8 anos de idade, apresentou defeitos hipoplásicos severos em toda a dentição permanente. Quando procurou atendimento, o

paciente apresentava hipocalcemia e hipocalcemia importantes que podem ter contribuído para a severidade dos defeitos. Em 2007, Elizabeth *et al*, relataram um fenótipo parecido com hipoplasias severas na forma de pontos afetando toda a dentição permanente em uma paciente com 20 anos que também havia sido diagnosticada aos 8 anos de idade. Os autores também observaram mordida aberta anterior sem associação com fatores ambientais, sugerindo que essa fosse uma das manifestações bucais da ATRd. No presente estudo, em nenhum dos três pacientes com ATRd e nefrocalcinose, foi observada mordida aberta anterior e nem todos os pacientes apresentaram hipoplasias severas. Nos sujeitos avaliados, o grau de severidade dos defeitos de desenvolvimento do esmalte variou em função da época em que a doença foi diagnosticada e foi instituído o tratamento para corrigir a acidose metabólica. Um número maior de pacientes é necessário para confirmar essa associação.

Até o momento, nos pacientes com ATRd e nefrocalcinose com ou sem surdez, têm sido relatadas mutações nos genes ATP6V1B1 e ATP6V0A4 (Karet *et al*, 1998; Karet *et al*, 1999; Smith *et al*, 2000; Alper, 2002). Em pacientes com ATRd, alterações visuais e distúrbios sanguíneos, têm sido relatada mutações no gene SLC4A1 (Cheidde *et al*, 2003). Nenhum desses genes tem sido estudado em pacientes com AI, mas o SLC4A1 codifica a proteína trocadora de ânions AE1, que também é expressa por ameloblastos durante a amelogênese (Lacruz *et al*, 2011b).

A ATP6V1 e ATP6V0A codificam subunidades da ATP6 que funciona como bomba de prótons na membrana de células α -intercaladas do ducto coletor distal (Jefferies *et al*, 2008). Quando algum distúrbio interfere nessa bomba de prótons impedindo que a urina seja acidificada, ocorre a ATRd, a qual têm sido relatada como uma das principais patologias associadas à nefrocalcinose (Adams & Rowe, 1992; Mantan *et al*, 2007). A nefrocalcinose nesses casos é causada pela acidose metabólica crônica que diminui a secreção de citrato e aumenta a excreção de cálcio, criando um meio favorável para a nefrolitíase e

nefrocalcinose. Ainda não há relatos sobre a expressão dessas proteínas por ameloblastos. Estudos futuros deverão ser direcionados para a análise de mutação abordando o gene candidato ATP6V1B1 nos pacientes 7 e 8 com surdez neurosensorial, e do gene ATP6V0A4 no paciente 9, sem surdez. Após confirmado o diagnóstico, estudos de imunolocalização dessas proteínas em ameloblastos poderão contribuir para melhor compreensão da etiologia dos defeitos de desenvolvimento de esmalte em pacientes com ATRd e nefrocalcinose.

Esse trabalho relata um novo caso de deficiência da ACII com fenótipo semelhante ao descrito anteriormente (Ismail *et al*, 1997). A severidade do quadro clínico e das manifestações bucais pode ser explicada pela expressão ubíqua da AC II nos ossos, cérebro, rins, eritrócitos, osteoclastos (Purkerson & Schwartz, 2007), e ameloblastos (Toyosawa *et al*, 1996; Wang *et al*, 2010).

No rins, a ACII é fundamental para a acidificação da urina no túbulo contorcido proximal. Um mecanismo de co-transporte realiza a reabsorção de Na^+ e HCO_3^- , e secreção de H^+ para o lúmen tubular. O trocador NHE3 participa dessa troca de Na^+ e H^+ com auxílio da Na^+/K^+ ATPase (Donowitz & Li, 2007). Ao reabsorver Na^+ , ocorre secreção de H^+ no lúmen tubular que se acopla ao HCO_3^- , formando ácido carbônico (H_2CO_3). Pela ação da Anidrase Carbônica IV (ACIV), rapidamente ocorre dissociação do H_2CO_3 em H_2O e CO_2 . O CO_2 difunde-se rapidamente para o interior das células. Intracelularmente, esse CO_2 combina-se com H_2O por ação da ACII, produzindo novamente, H_2CO_3 , que se dissocia produzindo H^+ e HCO_3^- e liberando o H^+ para ser secretado no lúmen. Dessa forma, uma deficiência na ACII impede que essa reação seja catalisada e o pH plasmático diminui e o paciente entra em acidose metabólica.

Nos osteoclastos, a ACII é importante para a criação de um meio ácido para regular a atividade de reabsorção óssea. Por isso, os pacientes com deficiência de ACII apresentam formação em excesso de um osso frável susceptível a fraturas (osteopetrose) e calcificações

cerebrais (Fathallah *et al*, 1994; Ismail *et al*, 1997). Além disso, podem apresentar problemas de crescimento, retardo mental, e outras alterações em decorrência de compressão do nervo craniano (Nagai *et al*, 1997; Awad *et al*, 2002).

Durante a amelogênese, a ACII participa do controle do pH (Lacruz *et al*, 2010a) e da via de sinalização para diferenciação dos ameloblastos (Wang *et al*, 2010), mas pouca atenção tem sido dada ao relato das manifestações bucais desses pacientes. A etiologia das hipoplasias nesses pacientes tanto pode estar relacionada à acidose metabólica, como diretamente ao defeito molecular na ACII influenciando a diferenciação dos ameloblastos e o controle do pH durante a amelogênese. Porém, ainda é necessário realizar a análise de mutação para comprovar a etiologia da doença nessa paciente.

Os resultados desse estudo associados aos relatos de caso já apresentados na literatura sugerem que pacientes com problemas renais hereditários e nefrocalcinose possam apresentar AI. No entanto, não é possível definir se a etiologia dos defeitos de desenvolvimento do esmalte está relacionada a um defeito molecular primário que induz à nefrocalcinose e à AI, ou se tanto a nefrocalcinose como a AI são secundárias aos distúrbios nas condições de homeostase sistêmica que o paciente apresenta em decorrência do problema renal.

O principal objetivo no início desse estudo era saber se os pacientes com doenças renais hereditárias com nefrocalcinose produziam o mesmo fenótipo relatado na literatura. Para a FHHNC e para a ATRd, essa hipótese foi rejeitada. Além disso, os resultados sugerem que a etiologia e gravidade dos defeitos na FHHNC não dependem das condições sistêmicas, enquanto na ATRd, ela parece estar ligada ao grau de acidose metabólica.

Esse trabalho reforça a necessidade de encaminhamento de pacientes com doenças renais para avaliação odontológica. Como ainda não se sabe se os defeitos de desenvolvimento do esmalte são provocados por um fator etiológico direta ou indiretamente

envolvido na amelogênese, é importante que os estudos futuros realizem avaliação completa do paciente com descrições fenotípicas e avaliação bioquímica pormenorizada, a fim de se contribuir para melhor compreensão da relação de causa-efeito entre os distúrbios sistêmicos e as manifestações bucais. Futuramente, essas descrições podem auxiliar na determinação da etiologia e, talvez, na identificação de novas proteínas e genes candidatos para a AI.

7 CONCLUSÕES:

- 1) Na amostra estudada, todos os pacientes com doenças renais hereditárias e nefrocalcinose apresentaram defeitos de desenvolvimento de esmalte.
- 2) Os pacientes com FHHNC apresentaram defeitos de desenvolvimento do esmalte variando de opacidades difusas suaves a um fenótipo semelhante à AI.
- 3) Um paciente com FHHNC e AI hipomaturada e hipoplásica apresentou as substituições F85L na claudina-16 e G20D e L90R na claudina-19. O envolvimento dessas alterações na etiologia da doença precisa ser confirmado por meio de análise de indivíduos controle e estudos funcionais.
- 4) Um paciente com FHHNC e AI hipoplásica apresentou as substituições F85L na claudina-16 e G20D e R200Q na claudina-19. O envolvimento dessas alterações na etiologia da doença precisa ser confirmado por meio de análise de indivíduos controle e estudos funcionais.
- 5) Uma paciente apresentou FHHNC sem alterações no *CLDN19* e uma deleção no gene *CLDN16* que deverá ser confirmada por outros métodos.
- 6) Os pacientes com ATRd desse estudo apresentaram defeitos de desenvolvimento do esmalte variando de opacidades difusas a severas hipoplasias. A severidade dos defeitos teve correlação com o controle da acidose metabólica.
- 7) Uma paciente com osteopetrose, ATRd e nefrocalcinose apresentou, além dos defeitos de esmalte, outras manifestações bucais incluindo maloclusão, alterações na cronologia de erupção e retenção de dentes decíduos e permanentes..

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Acevedo AC, Chardin H, Staub JF, Septier D, Goldberg M (1996). Morphological study of amelogenesis in the rat lower incisor after thyro-parathyroidectomy, parathyroidectomy and thyroidectomy. *Cell Tissue Res* 283(1):151-7.
- Acevedo AC, Chardin H, Risnes S (2002). Development of enamel defects in rat mandibular incisor after thyro-parathyroidectomy. *Connect Tissue Res* 43(2-3):490-5.
- Adams ND, Rowe JC (1992). Nephrocalcinosis. *Clin Perinatol* 19(1):179-95.
- Al-Nowaiser A, Roberts GJ, Trompeter RS, Wilson M, Lucas VS (2003). Oral health in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 18(1):39-45.
- Aldred MJ, Crawford PJ (1995). Amelogenesis imperfecta--towards a new classification. *Oral Dis* 1(1):2-5.
- Aldred MJ, Savarirayan R, Crawford PJ (2003). Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21st century. *Oral Dis* 9(1):19-23.
- Alper SL (2002). Genetic diseases of acid-base transporters. *Annu Rev Physiol* 64(899-923).
- Arquitt CK, Boyd C, Wright JT (2002). Cystic fibrosis transmembrane regulator gene (CFTR) is associated with abnormal enamel formation. *J Dent Res* 81(7):492-6.
- Awad M, Al-Ashwal AA, Sakati N, Al-Abbad AA, Bin-Abbas BS (2002). Long-term follow up of carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Saudi Med J* 23(1):25-9.
- Backman B, Holmgren G (1988). Amelogenesis imperfecta: a genetic study. *Hum Hered* 38(4):189-206.
- Bartlett JD, Simmer JP (1999). Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med* 10(4):425-41.
- Bawden JW, Wennberg A (1979). Ameloblasts--ion transport function. *J Dent Res* 58(Spec Issue B):708-16.
- Bawden JW (1989). Calcium transport during mineralization. *Anat Rec* 224(2):226-33.
- Becerik S, Cogulu D, Emingil G, Han T, Hart PS, Hart TC (2009). Exclusion of candidate genes in seven Turkish families with autosomal recessive amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A* 149A(7):1392-8.
- Bello IO, Soini Y, Slootweg PJ, Salo T (2007). Claudins 1, 4, 5, 7 and occludin in ameloblastomas and developing human teeth. *J Oral Pathol Med* 36(1):48-54.
- Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, et al. (2001). Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* 59(6):2206-15.
- Bonucci E, Lozupone E, Silvestrini G, Favia A, Mocetti P (1994). Morphological studies of hypomineralized enamel of rat pups on calcium-deficient diet, and of its changes after return to normal diet. *Anat Rec* 239(4):379-95.

- Bronckers A, Kalogeraki L, Jorna HJ, Wilke M, Bervoets TJ, Lyaruu DM, et al. (2011). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in maturation stage ameloblasts, odontoblasts and bone cells. *Bone* 46(4):1188-96.
- Bronckers AL, Lyaruu DM, DenBesten PK (2009a). The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res* 88(10):877-93.
- Bronckers AL, Lyaruu DM, Jansen ID, Medina JF, Kellokumpu S, Hoeben KA, et al. (2009b). Localization and function of the anion exchanger Ae2 in developing teeth and orofacial bone in rodents. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312B(4):375-87.
- Brook AH, Fearne JM, Smith JM (1997). Environmental causes of enamel defects. *Ciba Found Symp* 205(212-21; discussion 221-5).
- Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, et al. (2002). Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 277(51):49598-604.
- Cetrullo N, Guadagni MG, Piana G (2006). Two cases of familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: dental findings. *Eur J Paediatr Dent* 7(3):146-50.
- Chang EH, Lacruz RS, Bromage TG, Bringas P, Jr., Welsh MJ, Zabner J, et al. (2011). Enamel pathology resulting from loss of function in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in a porcine animal model. *Cells Tissues Organs* 194(2-4):249-54.
- Chardin H, Acevedo AC, Risnes S (1998). SEM study of the development of rat incisor enamel hypoplasia under hypocalcemia induced by thyro-parathyroidectomy. *Connect Tissue Res* 39(1-3):157-64; discussion 187-94.
- Cheidde L, Vieira TC, Lima PR, Saad ST, Heilberg IP (2003). A novel mutation in the anion exchanger 1 gene is associated with familial distal renal tubular acidosis and nephrocalcinosis. *Pediatrics* 112(6 Pt 1):1361-7.
- Crawford PJ, Aldred M, Bloch-Zupan A (2007). Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis* 2(17).
- Dellow EL, Harley KE, Unwin RJ, Wrong O, Winter GB, Parkins BJ (1998). Amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, and hypocalciuria syndrome in two siblings from a large family with consanguineous parents. *Nephrol Dial Transplant* 13(12):3193-6.
- Demirci FY, Chang MH, Mah TS, Romero MF, Gorin MB (2006). Proximal renal tubular acidosis and ocular pathology: a novel missense mutation in the gene (SLC4A4) for sodium bicarbonate cotransporter protein (NBCe1). *Mol Vis* 12(324-30).
- Deutsch D, Palmon A, Dafni L, Catalano-Sherman J, Young MF, Fisher LW (1995). The enamelin (tuftelin) gene. *Int J Dev Biol* 39(1):135-43.
- Ding Y, Estrella MR, Hu YY, Chan HL, Zhang HD, Kim JW, et al. (2009). Fam83h is associated with intracellular vesicles and ADHCAI. *J Dent Res* 88(11):991-6.
- Donowitz M, Li X (2007). Regulatory binding partners and complexes of NHE3. *Physiol Rev* 87(3):825-72.
- dos Santos Neto P, dos Santos L, Coletta RD, Laranjeira AL, de Oliveira Santos CC, Bonan PR, et al. (2011). Imaging evaluation of the gingival fibromatosis and dental abnormalities syndrome. *Dentomaxillofac Radiol* 40(4):236-43.

- Efrati E, Arsentiev-Rozenfeld J, Zelikovic I (2005). The human paracellin-1 gene (hPCLN-1): renal epithelial cell-specific expression and regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 288(2):F272-83.
- El-Sayed W, Parry DA, Shore RC, Ahmed M, Jafri H, Rashid Y, et al. (2009). Mutations in the beta propeller WDR72 cause autosomal-recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 85(5):699-705.
- Elizabeth J, Lakshmi Priya E, Umadevi KM, Ranganathan K (2007). Amelogenesis imperfecta with renal disease--a report of two cases. *J Oral Pathol Med* 36(10):625-8.
- Evan AP, Bledsoe SB, Smith SB, Bushinsky DA (2004). Calcium oxalate crystal localization and osteopontin immunostaining in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int* 65(1):154-61.
- Faguer S, Chauveau D, Cintas P, Tack I, Cointault O, Rostaing L, et al. (2010). Renal, Ocular, and Neuromuscular Involvements in Patients with CLDN19 Mutations. *Clin J Am Soc Nephrol* 6(2):355-60.
- Faguer S, Chauveau D, Cintas P, Tack I, Cointault O, Rostaing L, et al. (2011). Renal, Ocular, and Neuromuscular Involvements in Patients with CLDN19 Mutations. *Clin J Am Soc Nephrol* 6(2):355-60.
- Fathallah DM, Bejaoui M, Sly WS, Lakhoua R, Dellagi K (1994). A unique mutation underlying carbonic anhydrase II deficiency syndrome in patients of Arab descent. *Hum Genet* 94(5):581-2.
- FDI (1992). A review of the developmental defects of enamel index (DDE Index). Commission on Oral Health, Research & Epidemiology. Report of an FDI Working Group. *Int Dent J* 42(6):411-26.
- Fincham AG, Moradian-Oldak J, Diekwisch TG, Lyaruu DM, Wright JT, Bringas P, Jr., et al. (1995). Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix. *J Struct Biol* 115(1):50-9.
- Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP (1999). The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* 126(3):270-99.
- Fukae M, Tanabe T, Uchida T, Lee SK, Ryu OH, Murakami C, et al. (1998). Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. *J Dent Res* 77(8):1580-8.
- Gao Y, Wang W, Sun Y, Zhang J, Li D, Wei Y, et al. (2010). Distribution of amelotin in mouse tooth development. *Anat Rec (Hoboken)* 293(1):135-40.
- Haisch L, Almeida JR, Abreu da Silva PR, Schlingmann KP, Konrad M (2011). The role of tight junctions in paracellular ion transport in the renal tubule: lessons learned from a rare inherited tubular disorder. *Am J Kidney Dis* 57(2):320-30.
- Hall RK, Phakey P, Palamara J, McCredie DA (1995). Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome. Case studies of clinical features and ultrastructure of tooth enamel in two siblings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79(5):583-92.
- Hart PS, Michalec MD, Seow WK, Hart TC, Wright JT (2003). Identification of the enamelin (g.8344delG) mutation in a new kindred and presentation of a standardized ENAM nomenclature. *Arch Oral Biol* 48(8):589-96.

- Hata M, Kawamoto T, Kawai M, Yamamoto T (2010). Differential expression patterns of the tight junction-associated proteins occludin and claudins in secretory and mature ameloblasts in mouse incisor. *Med Mol Morphol* 43(2):102-6.
- Himmerkus N, Shan Q, Goerke B, Hou J, Goodenough DA, Bleich M (2008). Salt and acid-base metabolism in claudin-16 knockdown mice: impact for the pathophysiology of FHHNC patients. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(6):F1641-7.
- Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, et al. (2008). Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 118(2):619-28.
- Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, et al. (2009). Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(36):15350-5.
- Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, et al. (1997). Cloning and characterization of porcine enamel mRNAs. *J Dent Res* 76(11):1720-9.
- Hunter L, Addy LD, Knox J, Drage N (2007). Is amelogenesis imperfecta an indication for renal examination? *Int J Paediatr Dent* 17(1):62-5.
- Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y (2008). Differential expression of the tight junction proteins, claudin-1, claudin-4, occludin, ZO-1, and PAR3, in the ameloblasts of rat upper incisors. *Anat Rec (Hoboken)* 291(5):577-85.
- Ismail EA, Abul Saad S, Sabry MA (1997). Nephrocalcinosis and urolithiasis in carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Eur J Pediatr* 156(12):957-62.
- Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-Ganss E, Miller M, Nguyen V, Nourkeyhani H, et al. (2005). Amelotin--a Novel Secreted, Ameloblast-specific Protein. *J Dent Res* 84(12):1127-32.
- Jefferies KC, Cipriano DJ, Forgac M (2008). Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Arch Biochem Biophys* 476(1):33-42.
- Joao SM, Arana-Chavez VE (2004). Tight junctions in differentiating ameloblasts and odontoblasts differentially express ZO-1, occludin, and claudin-1 in early odontogenesis of rat molars. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 277(2):338-43.
- Josephsen K, Takano Y, Frische S, Praetorius J, Nielsen S, Aoba T, et al. (2011). Ion transporters in secretory and cyclically modulating ameloblasts: a new hypothesis for cellular control of preeruptive enamel maturation. *Am J Physiol Cell Physiol* 299(6):C1299-307.
- Karet FE, Gainza FJ, Gyory AZ, Unwin RJ, Wrong O, Tanner MJ, et al. (1998). Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11):6337-42.
- Karet FE, Finberg KE, Nelson RD, Nayir A, Mocan H, Sanjad SA, et al. (1999). Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet* 21(1):84-90.
- Kari JA, Farouq M, Alshaya HO (2003). Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Pediatr Nephrol* 18(6):506-10.
- Kawamoto T, Shimizu M (1997). Pathway and speed of calcium movement from blood to mineralizing enamel. *J Histochem Cytochem* 45(2):213-30.

- Kida M, Ariga T, Shirakawa T, Oguchi H, Sakiyama Y (2002). Autosomal-dominant hypoplastic form of amelogenesis imperfecta caused by an enamelin gene mutation at the exon-intron boundary. *J Dent Res* 81(11):738-42.
- Kim JW, Simmer JP, Hart TC, Hart PS, Ramaswami MD, Bartlett JD, et al. (2005). MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet* 42(3):271-5.
- Kim JW, Simmer JP, Lin BP, Seymen F, Bartlett JD, Hu JC (2006). Mutational analysis of candidate genes in 24 amelogenesis imperfecta families. *Eur J Oral Sci* 114 Suppl 1(3-12; discussion 39-41, 379).
- Kim JW, Lee SK, Lee ZH, Park JC, Lee KE, Lee MH, et al. (2008). FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 82(2):489-94.
- Kirzioglu Z, Ulu KG, Sezer MT, Yuksel S (2009). The relationship of amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14(11):e579-82.
- Knoers NV (2008). Inherited forms of renal hypomagnesemia: an update. *Pediatr Nephrol*.
- Koch MJ, Buhner R, Pioch T, Scharer K (1999). Enamel hypoplasia of primary teeth in chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 13(1):68-72.
- Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, et al. (2006). Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet* 79(5):949-57.
- Konrad M, Hou J, Weber S, Dotsch J, Kari JA, Seeman T, et al. (2008). CLDN16 genotype predicts renal decline in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* 19(1):171-81.
- Koppang HS, Stene T, Solheim T, Larheim TA, Winsnes A, Monn E, et al. (1984). Dental features in congenital persistent renal tubular acidosis of proximal type. *Scand J Dent Res* 92(6):489-95.
- Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM, Yamada Y (1996). Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. *J Biol Chem* 271(8):4431-5.
- Lacruz RS, Nanci A, Kurtz I, Wright JT, Paine ML (2010a). Regulation of pH During Amelogenesis. *Calcif Tissue Int* 86(2):91-103.
- Lacruz RS, Nanci A, White SN, Wen X, Wang H, Zalzal SF, et al. (2010b). The sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1) is essential for normal development of mouse dentition. *J Biol Chem* 285(32):24432-8.
- Lacruz RS, Smith CE, Bringasjr P, Chen YB, Smith SM, Snead ML, et al. (2011a). Identification of novel candidate genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling. *J Cell Physiol*.
- Lacruz RS, Smith CE, Moffatt P, Chang EH, Bromage TG, Bringas P, Jr., et al. (2011b). Requirements for ion and solute transport, and pH regulation, during enamel maturation. *J Cell Physiol*.

- Lagerstrom M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Backman B, Landegren U, et al. (1991). A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics* 10(4):971-5.
- Leblond CP, Warshawsky H (1979). Dynamics of enamel formation in the rat incisor tooth. *J Dent Res* 58(Spec Issue B):950-75.
- Lieske JC, Toback FG (1993). Regulation of renal epithelial cell endocytosis of calcium oxalate monohydrate crystals. *Am J Physiol* 264(5 Pt 2):F800-7.
- Limeback H, Schlumbohm C, Sen A, Nikiforuk G (1992). The effects of hypocalcemia/hypophosphatemia on porcine bone and dental hard tissues in an inherited form of type 1 pseudo-vitamin D deficiency rickets. *J Dent Res* 71(2):346-52.
- Lin HM, Nakamura H, Noda T, Ozawa H (1994). Localization of H(+)-ATPase and carbonic anhydrase II in ameloblasts at maturation. *Calcif Tissue Int* 55(1):38-45.
- Lozupone E, Favia A (1989). Effects of a low calcium maternal and weaning diet on the thickness and microhardness of rat incisor enamel and dentine. *Arch Oral Biol* 34(7):491-8.
- Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP (2008). Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem* 389(6):695-700.
- Lubinsky M, Angle C, Marsh PW, Witkop CJ, Jr. (1985). Syndrome of amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, impaired renal concentration, and possible abnormality of calcium metabolism. *Am J Med Genet* 20(2):233-43.
- Lunt RC, Law DB (1974). A review of the chronology of calcification of deciduous teeth. *J Am Dent Assoc* 89(3):599-606.
- Lyaruu DM, Bronckers AL, Mulder L, Mardones P, Medina JF, Kellokumpu S, et al. (2008). The anion exchanger Ae2 is required for enamel maturation in mouse teeth. *Matrix Biol* 27(2):119-27.
- MacDougall M, Simmons D, Dodds A, Knight C, Luan X, Zeichner-David M, et al. (1998). Cloning, characterization, and tissue expression pattern of mouse tuftelin cDNA. *J Dent Res* 77(12):1970-8.
- MacGibbon D (1972). Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction. *Aust Dent J* 17(1):61-3.
- Mantan M, Bagga A, Viridi VS, Menon S, Hari P (2007). Etiology of nephrocalcinosis in northern Indian children. *Pediatr Nephrol* 22(6):829-33.
- Martelli-Junior H, dos Santos Neto PE, de Aquino SN, de Oliveira Santos CC, Borges SP, Oliveira EA, et al. (2011a). Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome: a case report and review of the literature. *Nephron Physiol* 118(3):p62-5.
- Martelli-Junior H, Santos Neto PE, Aquino SN, Santos CC, Borges SP, Oliveira EA, et al. (2011b). Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome: a case report and review of the literature. *Nephron Physiol* 118(3):p62-5.
- Martins C, Siqueira WL, Guimaraes Primo LS (2008). Oral and salivary flow characteristics of a group of Brazilian children and adolescents with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 23(4):619-24.
- Michon F, Tummers M, Kyyronen M, Frilander MJ, Thesleff I (2010). Tooth morphogenesis and ameloblast differentiation are regulated by micro-RNAs. *Dev Biol* 340(2):355-68.

- Moffatt P, Smith CE, Sooknanan R, St-Arnaud R, Nanci A (2006). Identification of secreted and membrane proteins in the rat incisor enamel organ using a signal-trap screening approach. *Eur J Oral Sci* 114 Suppl 1(139-46; discussion 164-5, 380-1).
- Monserrat JL, Rapado A, Castrillo JM, Diaz Curiel M, Traba ML (1979). [Nephrocalcinosis as a clinical syndrome. Study of 77 cases (author's transl)]. *Med Clin (Barc)* 73(8):305-11.
- Moradian-Oldak J, Leung W, Fincham AG (1998). Temperature and pH-dependent supramolecular self-assembly of amelogenin molecules: a dynamic light-scattering analysis. *J Struct Biol* 122(3):320-7.
- Nagai R, Kooh SW, Balfe JW, Fenton T, Halperin ML (1997). Renal tubular acidosis and osteopetrosis with carbonic anhydrase II deficiency: pathogenesis of impaired acidification. *Pediatr Nephrol* 11(5):633-6.
- Nanci A, Mocetti P, Sakamoto Y, Kunikata M, Lozupone E, Bonucci E (2000). Morphological and immunocytochemical analyses on the effects of diet-induced hypocalcemia on enamel maturation in the rat incisor. *J Histochem Cytochem* 48(8):1043-58.
- Ng PC, Henikoff S (2001). Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11(5):863-74.
- Nishikawa S (1992). Correlation of the arrangement pattern of enamel rods and secretory ameloblasts in pig and monkey teeth: a possible role of the terminal webs in ameloblast movement during secretion. *Anat Rec* 232(4):466-78.
- Normand de la Tranchade I, Bonarek H, Marteau JM, Boileau MJ, Nancy J (2003). Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis: a new case of this rare syndrome. *J Clin Pediatr Dent* 27(2):171-5.
- Nunn JH, Sharp J, Lambert HJ, Plant ND, Coulthard MG (2000). Oral health in children with renal disease. *Pediatr Nephrol* 14(10-11):997-1001.
- O'Sullivan J, Bitu CC, Daly SB, Urquhart JE, Barron MJ, Bhaskar SS, et al. (2011). Whole-Exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome. *Am J Hum Genet* 88(5):616-20.
- Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Sasaki Y, Takami M, Shinkai Y, et al. (2000). A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. *Genomics* 68(3):229-36.
- Okumura R, Shibukawa Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Nakagawa K, Tazaki M, et al. (2010). Sodium-calcium exchangers in rat ameloblasts. *J Pharmacol Sci* 112(2):223-30.
- Ozdemir D, Hart PS, Firatli E, Aren G, Ryu OH, Hart TC (2005a). Phenotype of ENAM mutations is dosage-dependent. *J Dent Res* 84(11):1036-41.
- Ozdemir D, Hart PS, Ryu OH, Choi SJ, Ozdemir-Karatas M, Firatli E, et al. (2005b). MMP20 active-site mutation in hypomaturational amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 84(11):1031-5.
- Paine ML, Snead ML (2005). Tooth developmental biology: disruptions to enamel-matrix assembly and its impact on biomineralization. *Orthod Craniofac Res* 8(4):239-51.
- Paine ML, Snead ML, Wang HJ, Abuladze N, Pushkin A, Liu W, et al. (2008). Role of NBCe1 and AE2 in secretory ameloblasts. *J Dent Res* 87(4):391-5.

- Papagerakis P, Lin HK, Lee KY, Hu Y, Simmer JP, Bartlett JD, et al. (2008). Premature stop codon in MMP20 causing amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 87(1):56-9.
- Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, Shore RC, Jalili IK, Dollfus H, et al. (2009). Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 84(2):266-73.
- Paula LM, Melo NS, Silva Guerra EN, Mestrinho DH, Acevedo AC (2005). Case report of a rare syndrome associating amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis in a consanguineous family. *Arch Oral Biol* 50(2):237-42.
- Phakey P, Palamara J, Hall RK, McCredie DA (1995). Ultrastructural study of tooth enamel with amelogenesis imperfecta in AI-nephrocalcinosis syndrome. *Connect Tissue Res* 32(1-4):253-9.
- Pindborg JJ (1982). Aetiology of developmental enamel defects not related to fluorosis. *Int Dent J* 32(2):123-34.
- Praga M, Vara J, Gonzalez-Parra E, Andres A, Alamo C, Araque A, et al. (1995). Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int* 47(5):1419-25.
- Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC (1998). Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Hum Mol Genet* 7(3):563-9.
- Proctor R, Kumar N, Stein A, Moles D, Porter S (2005). Oral and dental aspects of chronic renal failure. *J Dent Res* 84(3):199-208.
- Purkerson JM, Schwartz GJ (2007). The role of carbonic anhydrases in renal physiology. *Kidney Int* 71(2):103-15.
- Rajpar MH, Harley K, Laing C, Davies RM, Dixon MJ (2001). Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet* 10(16):1673-7.
- Rao S, Witkop CJ, Jr. (1971). Inherited defects in tooth structure. *Birth Defects Orig Artic Ser* 7(7):153-84.
- Robinson C, Brookes SJ, Bonass WA, Shore RC, Kirkham J (1997). Enamel maturation. *Ciba Found Symp* 205(156-70; discussion 170-4).
- Salama AH, Zaki AE, Eisenmann DR (1987). Cytochemical localization of Ca²⁺-Mg²⁺ adenosine triphosphatase in rat incisor ameloblasts during enamel secretion and maturation. *J Histochem Cytochem* 35(4):471-82.
- Salama AH, Eisenmann DR, Zaki AE (1989). Effect of cobalt on Ca²⁺-Mg²⁺ ATPase in rat incisor maturation ameloblasts. *Calcif Tissue Int* 45(5):298-304.
- Santos MC, Hart PS, Ramaswami M, Kanno CM, Hart TC, Line SR (2007). Exclusion of known gene for enamel development in two Brazilian families with amelogenesis imperfecta. *Head Face Med* 3(8).
- Sarnat H, Moss SJ (1985). Diagnosis of enamel defects. *N Y State Dent J* 51(2):103-4, 106.
- Sasaki S, Takagi T, Suzuki M (1991). Cyclical changes in pH in bovine developing enamel as sequential bands. *Arch Oral Biol* 36(3):227-31.

- Sasaki T, Higashi S, Tachikawa T, Yoshiki S (1982). Formation of tight junctions in differentiating and secretory ameloblasts of rat molar tooth germs. *Arch Oral Biol* 27(12):1059-68.
- Sasaki T, Garant PR (1986). Ultracytochemical demonstration of ATP-dependent calcium pump in ameloblasts of rat incisor enamel organ. *Calcif Tissue Int* 39(2):86-96.
- Sasaki T, Colflesh DE, Garant PR (1987). Calcium transport by a calmodulin-regulated Ca-ATPase in the enamel organ. *Adv Dent Res* 1(2):213-26.
- Sasaki T, Tadokoro K, Yanagisawa T, Higashi S, Garant PR (1988). H⁺-K⁺-ATPase activity in the rat incisor enamel organ during enamel formation. *Anat Rec* 221(4):823-33.
- Sayer JA, Carr G, Simmons NL (2004). Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clin Sci (Lond)* 106(6):549-61.
- Shan Q, Himmerkus N, Hou J, Goodenough DA, Bleich M (2009). Insights into driving forces and paracellular permeability from claudin-16 knockdown mouse. *Ann N Y Acad Sci* 1165(148-51).
- Simmer JP, Fincham AG (1995). Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 6(2):84-108.
- Simmer JP, Hu JC (2002). Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect Tissue Res* 43(2-3):441-9.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, et al. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285(5424):103-6.
- Sire JY, Davit-Beal T, Delgado S, Gu X (2007). The origin and evolution of enamel mineralization genes. *Cells Tissues Organs* 186(1):25-48.
- Skobe Z, LaFrazia F, Prostack K (1985). Correlation of apical and lateral membrane modulations of maturation ameloblasts. *J Dent Res* 64(8):1055-61.
- Smith AN, Skaug J, Choate KA, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, et al. (2000). Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat Genet* 26(1):71-5.
- Smith CE, Nanci A, Moffatt P (2006). Evidence by signal peptide trap technology for the expression of carbonic anhydrase 6 in rat incisor enamel organs. *Eur J Oral Sci* 114 Suppl 1(147-53; discussion 164-5, 380-1).
- Snead ML, Luo W, Lau EC, Slavkin HC (1988). Spatial- and temporal-restricted pattern for amelogenin gene expression during mouse molar tooth organogenesis. *Development* 104(1):77-85.
- Somogyi-Ganss E, Nakayama Y, Iwasaki K, Nakano Y, Stolf D, McKee MD, et al. (2011). Comparative Temporospatial Expression Profiling of Murine Amelotin Protein during Amelogenesis. *Cells Tissues Organs*.
- Souza MA, Soares Junior LA, Santos MA, Vaisbich MH (2010). Dental abnormalities and oral health in patients with Hypophosphatemic rickets. *Clinics (Sao Paulo)* 65(10):1023-6.
- Suckling GW (1989). Developmental defects of enamel--historical and present-day perspectives of their pathogenesis. *Adv Dent Res* 3(2):87-94.

- Suda N, Kitahara Y, Ohyama K (2006). A case of amelogenesis imperfecta, cleft lip and palate and polycystic kidney disease. *Orthod Craniofac Res* 9(1):52-6.
- Sui W, Boyd C, Wright JT (2003). Altered pH regulation during enamel development in the cystic fibrosis mouse incisor. *J Dent Res* 82(5):388-92.
- Takano Y, Matsuo S, Wakisaka S, Ichikawa H, Nishikawa S, Akai M (1989). Histochemical localization of calcium in the enamel organ of rat incisors in early-stage amelogenesis. *Acta Anat (Basel)* 134(4):305-11.
- Thesleff I, Aberg T (1997). Tooth morphogenesis and the differentiation of ameloblasts. *Ciba Found Symp* 205(3-12; discussion 12-7).
- Toyosawa S, Ogawa Y, Inagaki T, Ijuhin N (1996). Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isozyme II in rat incisor epithelial cells at various stages of amelogenesis. *Cell Tissue Res* 285(2):217-25.
- Urzua B, Ortega-Pinto A, Morales-Bozo I, Rojas-Alcayaga G, Cifuentes V (2011). Defining a New Candidate Gene for Amelogenesis Imperfecta: From Molecular Genetics to Biochemistry. *Biochem Genet*.
- Wang X, Suzawa T, Ohtsuka H, Zhao B, Miyamoto Y, Miyauchi T, et al. (2010). Carbonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via intracellular pH-dependent JNK signaling pathway. *J Cell Physiol* 225(3):709-19.
- Warshawsky H, Smith CE (1974). Morphological classification of rat incisor ameloblasts. *Anat Rec* 179(4):423-46.
- Weber S, Hoffmann K, Jeck N, Saar K, Boeswald M, Kuwertz-Broeking E, et al. (2000). Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet* 8(6):414-22.
- Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Ronnefarth G, Boswald M, et al. (2001). Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* 12(9):1872-81.
- Wiedemann-Bidlack FB, Beniash E, Yamakoshi Y, Simmer JP, Margolis HC (2007). pH triggered self-assembly of native and recombinant amelogenins under physiological pH and temperature in vitro. *J Struct Biol* 160(1):57-69.
- Winsnes A, Monn E, Stokke O, Feyling T (1979). Congenital persistent proximal type renal tubular acidosis in two brothers. *Acta Paediatr Scand* 68(6):861-8.
- Witkop CJ (1957). Hereditary defects in enamel and dentin. *Acta Genet Stat Med* 7(1):236-9.
- Wright JT, Kiefer CL, Hall KI, Grubb BR (1996). Abnormal enamel development in a cystic fibrosis transgenic mouse model. *J Dent Res* 75(4):966-73.
- Wright JT, Hart PS, Aldred MJ, Seow K, Crawford PJ, Hong SP, et al. (2003). Relationship of phenotype and genotype in X-linked amelogenesis imperfecta. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1(72-8).
- Wright JT (2006). The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A* 140(23):2547-55.
- Wright JT, Daly B, Simmons D, Hong S, Hart SP, Hart TC, et al. (2006). Human enamel phenotype associated with amelogenesis imperfecta and a kallikrein-4 (g.2142G>A) proteinase mutation. *Eur J Oral Sci* 114 Suppl 1(13-7; discussion 39-41, 379).

Wright JT, Torain M, Long K, Seow K, Crawford P, Aldred MJ, et al. (2011). Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families. *Cells Tissues Organs* 194(2-4):279-83.

Yamaguti PM, Arana-Chavez VE, Acevedo AC (2005). Changes in amelogenesis in the rat incisor following short-term hypocalcaemia. *Arch Oral Biol* 50(2):185-8.

Zaki AE, Hand AR, Mednieks MI, Eisenmann DR, Borke JL (1996). Quantitative immunocytochemistry of Ca(2+)-Mg2+ ATPase in ameloblasts associated with enamel secretion and maturation in the rat incisor. *Adv Dent Res* 10(2):245-51.

Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, Lau E, MacDougall M, Moradian-Oldak J, et al. (1995). Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol* 39(1):69-92.

Zimmermann B, Plank C, Konrad M, Stohr W, Gravou-Apostolatos C, Rascher W, et al. (2006). Hydrochlorothiazide in CLDN16 mutation. *Nephrol Dial Transplant* 21(8):2127-32.

ANEXOS

ANEXO I: Parecer do CONEP



MINISTERIO DA SAUDE
Conselho Nacional de Saude
Comissao Nacional de Eficacia em Pesquisa - CONEP

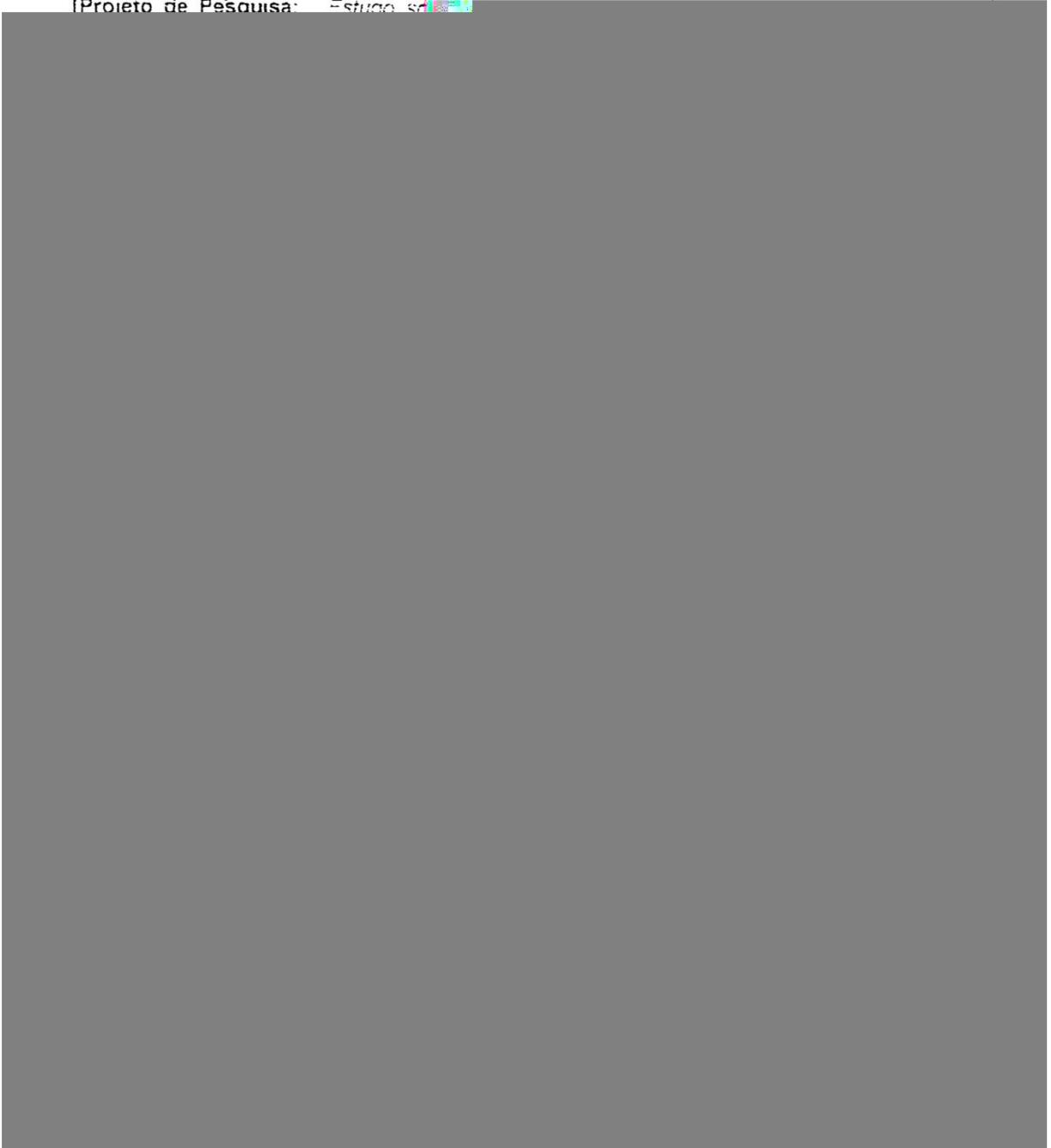
PARECER N° 1440/2001

Registro CONEP = 3120. Este n° devera ser citado nas correspondências referentes a este projeto

Protocolo CEP = 040/2001

Processo n° 25000.125975/2001-60

Projeto de Pesquisa: Estudo sobre



ANEXO II: Termo de consentimento livre e esclarecido

**Fundação Universidade de Brasília
Hospital universitário
Clínica de Anomalias de Desenvolvimento Dentário**

Termo de consentimento livre e esclarecido, pós-informação

O Sr.(a) _____, responsável pelo menor de idade _____, declara ter lido e ouvido o presente termo de responsabilidades que lhe informa estar ciente do seguinte:

- a) Que pelo presente instrumento concorda em participar de pesquisa com o objetivo de determinar o diagnóstico das doenças hereditárias Amelogênese Imperfeita, Dentinogênese Imperfeita e Anomalias Dentárias de número que são alterações que podem afetar vários membros da sua família e que afetam a formação dos dentes e os tecidos que-os formam, o esmalte e a dentina.
- b) Que esse exame será realizado no Hospital Universitário de Brasília (HUB), Universidade de Brasília.
- c) Que esta participação implicará na retirada de aproximadamente 20 ml de sangue de uma das veias do antebraço. Este material será utilizado com fins de pesquisa e diagnóstico e será usado para isolar o DNA que é o material genético de suas células.
- d) Que ao paciente será garantido o acesso aos resultados de seus exames.
- e) Que este procedimento é método de diagnóstico utilizado em Medicina, que implica em risco menor para a saúde, podendo, porém, provocar desconforto passageiro.
- f) Que a participação neste estudo não beneficiará diretamente o paciente, mas permitirá aprofundar o conhecimento sobre as doenças acima referidas, aperfeiçoando dessa forma, seu diagnóstico e tratamento.
- g) Que o sangue coletado será preservado e utilizado com fins exclusivos de pesquisa mantendo sigilo sobre a fonte de suas células.
- h) Que os procedimentos de coleta serão sem custos para o paciente.
- i) Que os resultados do exame genético serão sigilosos. Caso o estudo seja publicado em revistas ou livros científicos, a identidade do paciente não será revelada.
- j) Que será garantida ao paciente assistência odontológica continuada, na Clínica de Odontologia do Hospital Universitário de Brasília, ficando porém a seu critério a eventual procura por outro serviço ou profissional para orientação e tratamento.
- k) Que sua recusa em participar da presente pesquisa não implicará em prejuízo presente ou futuro na prestação de assistência profissional pelas equipes médicas do Hospital Universitário de Brasília, ficando também ressaltado que, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento o paciente ficará livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento.
- l) Que o responsável pela pesquisa será o Dra. Paulo Marcio Yamaguti que poderá ser contactado no HUB no telefone (61) 3448 5014 e no celular (61) 8177-0546.

Brasília, ___/___/____

Responsável pelo paciente

Responsável pela pesquisa

ANEXO III: Programação básica utilizada nas reações de PCR em todos os experimentos

PCR- Programação utilizada		
Etapa	Temperatura	Tempo
1	95°C	2 minutos
2	95°C	1 minuto
3	Temperatura de anelamento do primer	1 minuto
4	72 °C	1 minuto
5	Voltar à etapa 2 e repetir 34 vezes	
6	72 °C	5 minutos
7	4 °C	∞

ANEXO IV: Lista de primers utilizados para amplificação e sequenciamento do gene *SLC4A2*

Primer <i>SLCA2</i>	Sequência	Tm
Exon 2F	5'-CCATCCAGGTTATGCCTCCGC-3'	57°C
Exon 2R	5'-CCAGTCTCCACACTCACACACG-3'	
Exons 3-4F	5'-ACTGGGAAGGGTGAGGTTTCGG-3'	57°C
Exons 3-4R	5'-GGTCAGCACTGTCATCCTCTTGG-3'	
Exon 5F	5'-CCTGTCTCCACACCCTCCTC-3'	59°C
Exon 5R	5'-TCATGCTTTGTTCCAGCATCACCTC-3'	
Exons 6-7F	5'-GAGCTAGGAGGGCCTGGAGTC-3'	57°C
Exons 6-7R	5'-ACAGCTGGTCTGAGAGGTAGGG-3'	
Exon 8F	5'-TGGCTCCCTCTGACACCACTC-3'	60°C
Exon 8R	5'-ACGTGGGGCTCAAGACAGATTTGG-3'	
Exons 9-10F	5'-CTGCTCCCCATCCCATCTCCT-3'	59°C
Exons 9-10R	5'-CCCCTCCCACTCTGAGTCCAC-3'	
Exons 11-12F	5'-GAGGTGGAGCGAGAGGTGAG-3'	60°C
Exons 11-12R	5'-GGAGGCAGTCATGGGGATCAAG-3'	
Exons 13-14F	5'-AGTCTTGATCCCCATGACTGCCTC-3'	57°C
Exons 13-14R	5'-CTCCTAGGGGTGTAGGAACCAGC-3'	
Exons 15-16F	5'-GGTGAGGAGAGCCTTCAGGTAG-3'	60°C
Exons 15-16R	5'-GATGGGACCAAGAGACTCCCTC-3'	
Exons 17-18F	5'-CCTTCCACCCGACACTCACTG-3'	59°C
Exons 17-18R	5'-AAGCTTAAGGACAGGCTGGGTTTGG-3'	
Exon 19F	5'-CCTAAGATGCCATCCCCTTTCCATG-3'	60°C
Exon 19R	5'-CATCCACGGTTCCTGAGGTCC-3'	
Exons 20-21F	5'-CCAGGTTCCAAAGCCAGATGGAG-3'	60°C
Exons 20-21R	5'-AGCTGGAGAGTGACCCAAGTAG-3'	
Exons 22-23F	5'-CAGCTCTGGCACCTAGGAATG-3'	59°C
Exons 22-23R	5'-AAAAGGAGGGAGGGGCATGG-3'	

ANEXO V: Lista de primers utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes *CLDN16* e *CLDN19*

Primer <i>CLDN16</i>	Sequência	Tm
promoterF	5'- GCT AAT GTG TAC AGT AAT CAC CC -3'	53°C
promoterR	5'- TCC AGA ATT TCC GTT TTG AG -3	
exon 1F	5'- CAC TAG CCC ACA GTT GGG TC -3'	57°C
exon 1R	5'- TGT TGT ACA TGG CAG TTG GG -3'	
exon 2F	5'- TTT GCT ATC AAA CACAACCACC -3'	54°C
exon 2R	5'-GCACAAAATGGAAACCTGAAC-3'	
exon 3F	5'-ACTTTTACCGGAGGGGTGTG-3'	57°C
exon 3R	5'-TCAGCACAACCTCTCTCCTTCAC-3'	
exon 4F	5'-ACCTCTCTGAATCACGCCAG-3'	54°C
exon 4R	5'-TTCCTTTTGAAATTTGTTTCCAC-3'	
exon 5F	5'-AAAATAACAGGAAATCTACTTGGC-3'	54°C
exon 5R	5'-TGTGTGCATAAGGTGGAAGG-3'	

Primer <i>CLDN19</i>	Sequência	Tm
exon1F	5' - CCG CAC CAC CTC TCC TTC-3`	59°C
exon1R	5' - AGG AAT CTG GAC CCA CAG C-3`	
exon2F	5' - GTT GAC AGT GAA GGG GAC TCT C-3`	54°C
exon2R	5' - AGA CAG CAG TCA AAG TGC AGA G-3`	
exon3F	5' - AGA CAG CAA CCC CAT TGC-3`	57°C
exon3R	5' - CCC CCT TTA AAG CTT CTT GG-3`	
exon4F	5' - GGA AGA GCA TTC ACC TCA ATT T-3`	54°C
exon4R	5' - TTG AGG ACA AGC TGC TCA GA-3`	
exon5F	5' - AGG GAG GGT CTG AGT TTA GGT C-3`	59°C
exon5R	5' - CAC TGA CCA CTC TGA CAC AGG-3`	