

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Odontologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Caracterização fenotípica e genotípica de pacientes com amelogênese
imperfeita síndrômica**

Luan Deives Rodrigues Leite

Brasília, 07 de dezembro de 2023

Luan Deives Rodrigues Leite

Caracterização fenotípica e genotípica de pacientes com amelogenese imperfeita sindrômica

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe

Co-orientador: Dr. Paulo Marcio Yamaguti

Brasília, 2023

Luan Deives Rodrigues Leite

**Caracterização fenotípica e genotípica de pacientes com amelogênese
imperfeita sindrômica**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 07 de dezembro de 2023

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe (Orientadora)

Prof. Dr. André Ferreira Leite (Membro Titular)

Profa. Dra. Lilian Marly de Paula (Membro Titular)

Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra (Membro Suplente)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre abençoar meus passos e me dar forças para lutar pelos meus objetivos. Toda honra e toda glória sejam dadas a Ti, Senhor.

Aos meus pais Ivan Deives e Maria Arli, por todo sacrifício e apoio incondicional. Obrigado por me incentivarem desde o princípio. Minha gratidão por vossas vidas é imensurável.

À minha noiva Amanda. Por toda companhia em cada passo dado nessa jornada. Sou muito feliz em compartilhar a vida contigo. Sua presença constante foi fundamental para cada conquista.

À minha irmã Maria Eduarda. Pelo suporte e carinho.

Ao meu pet Spike. Por ter me proporcionado grandes momentos de alegria.

A todos os familiares e amigos que me acompanharam de perto durante esses anos.

À professora Ana Carolina, minha orientadora por quem tenho admiração e respeito. Por ter aberto as portas do mundo acadêmico para mim e despertado meu interesse pelo saber científico.

Ao meu co-orientador e padrinho profissional Paulo Yamaguti. Por ter sido minha referência durante toda a graduação. Obrigado pelo conhecimento que me foi dado, sou eternamente grato pelo que fez e plantou em mim.

Às companheiras de pesquisa Kêmelly Karolliny e Juliana Cardozo por toda cumplicidade.

A todos os colaboradores do presente trabalho e integrantes do grupo de pesquisa em Atenção Odontológica a Doenças Raras.

Agradeço aos pacientes e suas famílias pela participação no estudo. Que os resultados obtidos possam ajudar a vos proporcionar melhor qualidade de vida.

À minha turma e colegas de graduação por toda coragem para enfrentar os desafios do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Pelo apoio dado nas pesquisas de iniciação científica.

À Clínica Odontológica Pio XII, onde tive a oportunidade de ser estagiário por quase

2 anos e aprender com ótimos profissionais.

A todo o corpo docente do Departamento de Odontologia pelo conhecimento transmitido durante o curso.

À Universidade de Brasília. Por minha formação profissional.

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”

Albert Einstein

RESUMO

Objetivo: Realizar a caracterização fenotípica e genotípica de dois pacientes casos índices de duas famílias distintas com diagnóstico de amelogenese imperfeita (AI) autossômica recessiva sindrômica. **Métodos:** A caracterização fenotípica foi realizada por meio de exame clínico, radiografias panorâmicas, tomografia computadorizada, ultrassonografia e exames bioquímicos. Para o diagnóstico molecular foi realizado sequenciamento Sanger e de exoma completo. **Resultados:** Na família 1, a paciente afetada foi diagnosticada com deficiência da anidrase carbônica II (CAII) e apresentou osteopetrose, acidose tubular renal, fraturas ósseas recorrentes, má oclusão, distúrbios da erupção dentária e AI hipoplásica. O sequenciamento Sanger detectou a variante (c.753delG, p.Asn252Thrfs*14) no gene *CA2* em homozigose no caso índice e em heterozigose na mãe. Na família 2, o caso índice apresentou hipofosfatasia com leve acidose metabólica, sem a presença de nefrocalcinose ou nefrolitíase. O exame físico intraoral revelou fibromatose gengival, coroas clínicas reduzidas, perda de contatos interproximais e AI hipoplásica. O sequenciamento de exoma completo identificou duas variantes em heterozigose composta no gene *FAM20A* (c.406C>T, p.Arg136* / c.343_362delTCGCTCCTGGCCAGCCAGGA, p.Ser115Glyfs*48) e o diagnóstico final foi de Síndrome Esmalte Renal (ERS). **Conclusão:** Pela primeira vez, relata-se um caso de AI sindrômica ligada a variante no gene *CA2*. Sugere-se que a deficiência da CAII seja incluída no grupo de doenças renais hereditárias que manifestam AI. Além disso, a detecção da variante (c.343_362delTCGCTCCTGGCCAGCCAGGA, p.Ser115Glyfs*48) no caso índice da família 2, sem relatos prévios na literatura, amplia o espectro de variantes causativas de AI autossômica recessiva no gene *FAM20A*, aumentando o conhecimento sobre a ERS.

Palavras-chave: amelogenese imperfeita; osteopetrose; acidose tubular renal; anidrase carbônica II; nefrocalcinose; síndrome esmalte renal.

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to present a phenotypic and genotypic characterization of two patients from two families diagnosed with syndromic autosomal recessive amelogenesis imperfecta (AI). **Methods:** Medical records were reviewed. Oral examination, panoramic radiographs and computed tomography were performed. Sanger and whole exome sequencing were undertaken for molecular diagnosis. **Results:** The proband from family 1 was diagnosed with carbonic anhydrase II (CAII) deficiency syndrome and presented with osteopetrosis, renal tubular acidosis, recurrent bone fractures, dental malocclusion, tooth eruption impairment, and hypoplastic AI. Sanger sequencing revealed the proband was homozygous and the mother was heterozygous for a CA2 deletion (c.753delG, p.Asn252Thrfs*14). In the family 2, the index case presented with low serum phosphate levels and mild metabolic acidosis. Nephrocalcinosis and nephrolithiasis were absent. The oral findings included gingival fibromatosis, widely spaced teeth with reduced clinical crowns and hypoplastic AI. Whole exome sequencing identified two compound heterozygous *FAM20A* variants in the proband (c.406C>T, p.Arg136* / c.343_362delTCGCTCCTGGCCAGCCAGGA, p.Ser115Glyfs*48), and the final diagnosis was Enamel Renal Syndrome (ERS). **Conclusions:** For the first time, a CA2 disease-causing variant is reported to be associated with syndromic AI. This finding suggests that CAII deficiency syndrome should be included in the group of autosomal recessive diseases with renal and dental enamel involvement. Moreover, the detection of the novel variant (c.343_362delTCGCTCCTGGCCAGCCAGGA, p.Ser115Glyfs*48) in the proband from the family 2, which was not previously reported in the literature, expands the causative variants spectrum of *FAM20A* gene, increasing the knowledge about the ERS.

Keywords: amelogenesis imperfecta; osteopetrosis; renal tubular acidosis; carbonic anhydrase II; nephrocalcinosis; enamel renal syndrome.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 AMELOGÊNESE	11
2.2 AMELOGÊNESE IMPERFEITA.....	12
2.3 AMELOGÊNESE IMPERFEITA E DOENÇAS RENAI HEREDITÁRIAS	14
3 METODOLOGIA	16
3.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	16
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	16
3.3 SEQUENCIAMENTO SANGER.....	17
3.3 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA.....	18
4 RESULTADOS	19
4.1 FAMÍLIA 1 – PACIENTE III:1	19
4.2 FAMÍLIA 2 – PACIENTE III:2	22
5 DISCUSSÃO	27
6 CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS	31
ANEXOS	37
ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	37
ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	38
ANEXO III – CERTIFICADOS DA 39. ^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA	41
ANEXO IV – ARTIGO CIENTÍFICO E NORMAS DA REVISTA.....	43

1 INTRODUÇÃO

Amelogênese imperfeita (AI) é um grupo heterogêneo de defeitos de desenvolvimento do esmalte (DDE) hereditários [1]. A AI pode ser um traço isolado ou sindrômico que afeta todos ou quase todos os dentes em ambas as dentições. O modo de herança pode ser autossômico recessivo, autossômico dominante ou ligado ao cromossomo X. A AI é dividida em hipoplásica, hipomaturada e hipocalcificada. Na AI hipoplásica, a espessura ou forma do esmalte é alterada. Nos tipos hipomaturada e hipocalcificada, o esmalte apresenta mineralização ou maturação incompleta e dureza reduzida [2]. A deficiência da anidrase carbônica II (CAII) (#OMIM 259730), também conhecida como doença do cérebro de mármore ou síndrome de Guibaud-Vainsel, é uma doença autossômica recessiva caracterizada por densidade óssea aumentada e acidose metabólica, com a presença de osteopetrose, acidose tubular renal e calcificações cerebrais [3,4]. Os indivíduos afetados geralmente apresentam retardo mental por compressão de nervos cranianos, deficiência visual e auditiva, fraturas ósseas recorrentes e nefrocalcinose.

A CAII é uma enzima citoplasmática codificada pelo gene *CA2*, expressa principalmente nos ossos, cérebro, túbulos renais distais e eritrócitos [5]. Ela atua no controle do pH intracelular por meio da conversão de ácido carbônico (H_2CO_3) em bicarbonato (HCO_3^-) e prótons de hidrogênio (H^+). Além disso, ela está envolvida na diferenciação dos osteoclastos, reabsorção óssea e homeostase ácido-básica dos rins [6].

Nos últimos anos, estudos experimentais em animais demonstraram que os ameloblastos também expressam CAII durante a amelogênese, especialmente nos estágios de transição e maturação [7-9]. Em modelos animais, a CAII exerce função no controle do pH intracelular, o qual é essencial para o desenvolvimento normal do esmalte. Contudo, a caracterização do fenótipo do esmalte não tem sido o foco dos relatos clínicos, e as principais manifestações orais descritas são distúrbios da erupção dentária, cárie severa, apinhamento dentário e má oclusão [10-12].

A síndrome esmalte renal (ERS) (#OMIM 204690) é uma doença autossômica recessiva caracterizada por AI hipoplásica, fibromatose gengival e nefrocalcinose [13]. A etiologia molecular da ERS está ligada a variantes causativas no gene *FAM20A*, que codifica uma pseudoquinase envolvida no processo de biomineralização no esmalte dentário e diferentes tecidos [14].

Outras manifestações orais da ERS são: distúrbios da erupção dentária, calcificações intrapulpares, dilacerações radiculares, hiperplasia do folículo pericoronário, reabsorções coronárias e bordas incisais de incisivos em formato semilunar [15]. A ERS apresenta um conjunto de manifestações oro-dentais patognomônicas, e o diagnóstico normalmente é feito pelo cirurgião-dentista.

No ano de 2002, foi criado o Centro de Atendimento Odontológico a Doenças Raras na Unidade de Saúde Bucal do Hospital Universitário de Brasília (HUB), com a finalidade de diagnosticar e acompanhar pacientes com doenças raras e defeitos de desenvolvimento dentário/craniofacial, incluindo pacientes com AI. Desde então, 38 pacientes casos índices apresentaram diagnóstico clínico de AI, sendo 22 casos isolados e 16 sindrômicos. Atualmente, foi realizado sequenciamento genético em 12 famílias.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização fenotípica e genotípica de dois pacientes casos índices de duas famílias distintas com diagnóstico de AI autossômica recessiva sindrômica em atendimento no Hospital Universitário de Brasília (HUB).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AMELOGÊNESE

O esmalte dentário é o tecido mineralizado acelular que recobre a coroa dos dentes decíduos e permanentes. A amelogenese é o complexo processo de formação do esmalte dentário pelos ameloblastos, células epiteliais de origem ectodérmica com alto potencial metabólico e de transporte iônico. Durante a amelogenese, ocorre uma série de alterações celulares, com diferenciação dos ameloblastos, diferentes fases de desenvolvimento, além de diferentes eventos físico-químicos. A expressão e síntese de diversas proteínas, bem como o correto funcionamento e a integridade da estrutura celular são fundamentais para o desenvolvimento normal do esmalte [16,17].

A amelogenese é dividida em três fases funcionalmente distintas: pré-secreção, secreção e maturação (Figura 1). Na fase de pré-secreção, as células do epitélio interno do órgão do esmalte iniciam a diferenciação em ameloblastos e se preparam para a secreção da matriz orgânica, invertendo a sua polaridade e desenvolvendo um aparato de organelas para síntese proteica [18,19].

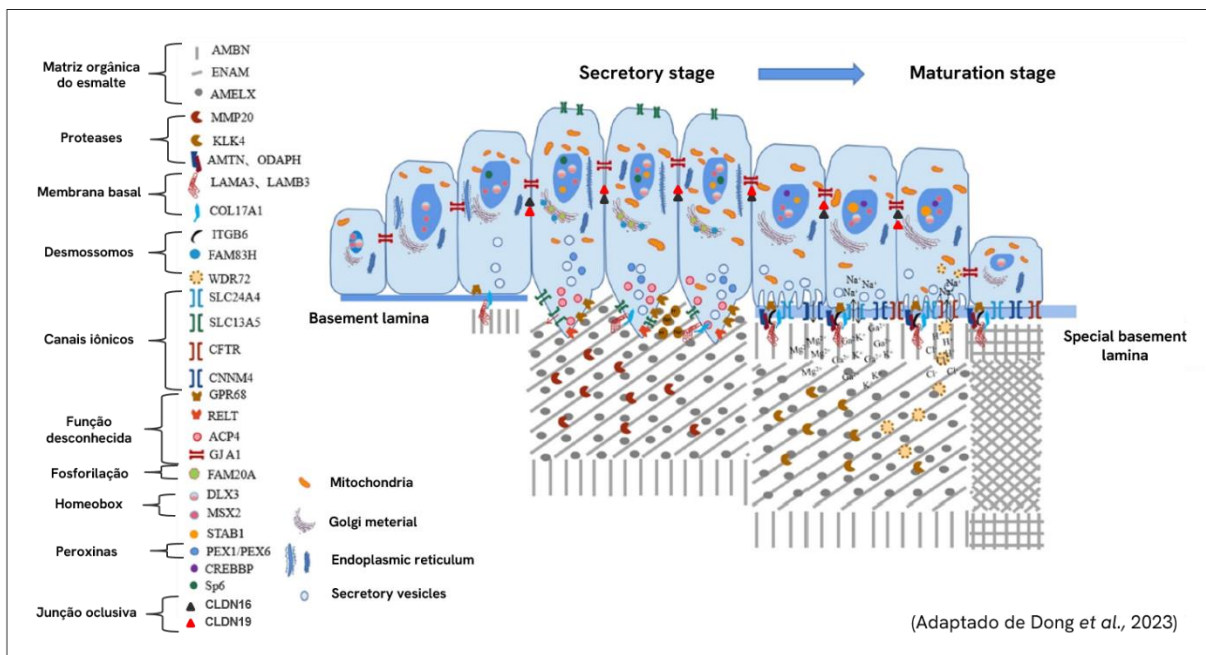


Figura 1. Representação ilustrativa da amelogenese, processo dinâmico, mediado por diferentes genes e proteínas, em que os ameloblastos passam por mudanças citofuncionais ao longo dos estágios de pré-secreção, secreção e maturação para a formação do esmalte.

No estágio de secreção, os ameloblastos diferenciados secretam a matriz orgânica do esmalte por meio do processo de Tomes, e iniciam-se a mineralização e o crescimento dos cristais de hidroxiapatita em comprimento [20]. O processo de Tomes é um prolongamento secretor que orienta a deposição de esmalte prismático e interprismático por meio de suas porções secretoras apical e lateral. A matriz orgânica do esmalte é constituída por 90% de proteínas amelogeninas e 10% de proteínas não amelogeninas. Alterações nesta etapa resultam em esmalte hipoplásico, com modificações em sua espessura e/ou forma [21].

Na maturação do esmalte, a matriz orgânica remanescente é degradada por proteases como calicreína-4 (KLK4) e enamelisina (MMP-20), sendo reabsorvida e possibilitando o crescimento dos cristais de hidroxiapatita em largura, finalizando o processo de mineralização do esmalte. Nesta etapa, os ameloblastos maduros alternam ciclicamente suas terminações em rugosas e lisas [22]. Falhas na fase de maturação resultam na hipomineralização da matriz tecidual, e o esmalte apresenta redução de dureza e aumento da porosidade.

Após a mineralização completa do esmalte, os ameloblastos se juntam às células do epitélio externo do órgão do esmalte, retículo estrelado e estrato intermediário para formação do epitélio reduzido do esmalte, que protege a superfície coronária até que o dente erupcione e seja exposto à cavidade bucal. O resultado final da amelogênese é o esmalte maduro, o tecido mais mineralizado do corpo humano, tendo em sua composição cerca de 96% de material inorgânico, 1% de matriz orgânica residual e 3% de água [23].

No processo de erupção dentária, o epitélio reduzido do esmalte se funde com o epitélio oral para formar o epitélio juncional, responsável pelo selamento biológico ao redor do dente. Assim, o esmalte é exposto à cavidade bucal e passa a interagir com os fluidos bucais, passando por sucessivos ciclos de des-remineralização no processo de maturação pós-eruptiva [24].

2.2 AMELOGÊNESE IMPERFEITA

Amelogênese imperfeita (AI) é um grupo heterogêneo de defeitos de desenvolvimento do esmalte (DDE) hereditários [1,2]. Estima-se que a prevalência de AI seja de 1:700 no norte da Suécia a 1:8.000 em Israel [25,26]. Ainda não há dados na literatura sobre a prevalência de AI no Brasil. O modo de herança pode ser

autossômico dominante, autossômico recessivo ou ligado ao cromossomo X.

A AI afeta todos ou quase todos os dentes nas dentições decídua e permanente, sendo caracterizada por alterações na quantidade e/ou qualidade do esmalte dentário. Os fenótipos de AI são variados, resultando em uma heterogeneidade clínica que depende do gene específico envolvido, da localização e tipo de variante, assim como do efeito a nível proteico. Nos últimos anos, tem se observado que a AI pode manifestar isoladamente ou como parte do espectro fenotípico de síndromes [2].

Diversas classificações de AI têm sido propostas ao longo dos anos. A classificação da AI proposta por Rao e Witkop em 1971 e revisada em 1988 baseava-se no aspecto clínico e modo de herança [27,28]. Nesta classificação, a AI era dividida em 4 tipos: 1) hipoplásica/defeitos quantitativos, modo de herança autossômico dominante, autossômico recessivo ou ligado ao cromossomo X; 2) hipomaturada/defeitos qualitativos, modo de herança autossômico dominante, autossômico recessivo ou ligado ao cromossomo X; 3) hipocalcificada/defeitos qualitativos, modo de herança autossômico dominante ou recessivo; 4) hipomaturada-hipoplásica com taurodontia/defeitos quantitativos e qualitativos, modo de herança apenas autossômico dominante. Esses 4 tipos ainda eram subdivididos em 14 subtipos de acordo com o fenótipo do esmalte e o modo de herança.

No entanto, por se basear no aspecto clínico, a classificação de Witkop apresentava limitações, uma vez que fenótipos distintos podem ser observados em indivíduos de uma mesma família, e que pacientes com diferentes padrões moleculares podem manifestar fenótipos parecidos. Assim, em 1995, foi proposta uma nova forma de classificação por Aldred e Crawford [29], que sugeria utilizar o padrão molecular e a natureza da variante como principais critérios para classificação.

Até o presente momento, ainda não há consenso sobre a classificação de AI, e a doença tem sido classificada, antes de qualquer subdivisão, em isolada ou síndrômica, considerando também o modo de herança e o fenótipo dentário [2]. Na última década, foram identificadas variantes causativas em diversos genes associados com a etiologia das formas isoladas de AI (*AMELX*, *ACP4*, *ENAM*, *MMP20*, *KLK4*, *FAM83H*, *WDR72*, *ITGB6*, *SLC24A4*, *COL17A1*, *LAMB3*, *LAMA3*, *GPR68*, *AMBN* e *C4orf26*). Nas formas síndrômicas, foram identificadas variantes nos genes *LTBP3*, *COL17A1*, *DLX3*, *FAM20A*, *CNNM4*, *ROGDI*, *LAMA3*, *LAMB3*, *ITGB4*, *CLDN16*, *CLDN19*, *PEX1*, *PEX6*, *STIM1* e *FAM20C* [30,31]. Todos esses genes codificam proteínas expressas pelos ameloblastos durante a amelogênese.

Na AI hipoplásica, o esmalte apresenta DDE quantitativos associados a falhas na fase de secreção da amelogênese. Clinicamente, são observados pontos, depressões, linhas horizontais, diminuição da espessura, alteração na forma ou até a ausência completa do esmalte [32]. Já a AI hipomineralizada é caracterizada pela presença de DDE qualitativos resultantes de falhas na maturação do esmalte, sendo subdividida em hipomaturada e hipocalcificada. O esmalte hipomaturado é frágil, com alterações de translucidez, e apresenta opacidades resultantes da mineralização incompleta da matriz tecidual [33]. As opacidades podem ser demarcadas ou difusas e, quanto à coloração, esbranquiçadas, amareladas, acastanhadas ou amarronzadas. Na AI hipocalcificada, o esmalte apresenta consistência amolecida devido ao transporte insuficiente de íons Ca^{2+} para a matriz tecidual.

Os pacientes com AI geralmente apresentam limitações funcionais e queixas estéticas. Os principais sinais e sintomas são hipersensibilidade dentinária, redução da eficiência mastigatória e comprometimento estético devido às alterações estruturais e de coloração dos dentes. O tratamento envolve procedimentos complexos, que buscam restabelecer a função mastigatória e melhorar a estética.

Apesar dos avanços na compreensão da AI, ainda há uma grande número de pacientes sem diagnóstico molecular definido. O processo complexo da amelogênese parece depender da participação de inúmeras proteínas ainda não identificadas. Estudos com abordagem de genes candidatos e sequenciamento Sanger têm identificado variantes causativas somente em cerca de 50% dos casos [34,35]. Assim, atualmente o uso do sequenciamento de nova geração (NGS), como o exoma completo, parece ser a melhor alternativa para os casos sem diagnóstico molecular definido [36]. O diagnóstico molecular é importante para a compreensão das bases moleculares da doença, identificação do padrão de herança e aconselhamento genético.

2.3 AMELOGÊNESE IMPERFEITA E DOENÇAS RENAIIS HEREDITÁRIAS

O mecanismo exato pelo qual uma variante genética pode estar envolvida na etiologia de AI e doenças renais hereditárias em humanos não é completamente compreendido. No entanto, assim como as células tubulares renais, os ameloblastos são células especializadas com alto potencial metabólico e de transporte iônico [17]. Por isso, sugere-se que pacientes com defeitos moleculares em proteínas expressas

tanto nos ameloblastos como nos rins podem apresentar tubulopatias e DDE generalizados concomitantemente [37].

Já foi descrita manifestação de AI sindrômica e nefrocalcinose em pacientes com doenças renais autossômicas recessivas ligadas a variantes causativas nos genes *CLDN16* (#OMIM 248250), *CLDN19* (#OMIM 248190), *FAM20A* (#OMIM 204690), *KCNJ1* (#OMIM 241200) e *SLC4A4* (#OMIM 604278). Todos esses genes são expressos nos ameloblastos e rins.

A nefrocalcinose é caracterizada pela presença de calcificações no parênquima renal. Sua etiologia está ligada a distúrbios eletrolíticos como hipercalcemia, hipercalcúria ou diminuição de inibidores de cristalização. Trata-se de uma condição diagnosticada por exames de imagem como radiografias, ultrassonografia ou tomografia computadorizada.

A Hipomagnesemia e Hipercalcúria Familiar com Nefrocalcinose (FHHNC) sem (#OMIM 248250) e com envolvimento ocular (#OMIM 248190) são doenças renais hereditárias causadas por mutações nas isoformas 16 e 19 da claudina. As claudinas são junções oclusivas que controlam a reabsorção paracelular de cálcio e magnésio. Os valores bioquímicos apresentam alterações de hipomagnesemia, hipercalcúria, nefrocalcinose, nefrolitíase, poliúria e polidipsia.

A Síndrome de Bartter (#OMIM 241200) é uma tubulopatia que manifesta alcalose metabólica e nefrocalcinose. Um outro tipo de tubulopatia induzida por mutações no gene *SLC4A4* foi descrita em pacientes com AI (#OMIM 604278), acidose tubular renal proximal, baixa estatura e problemas oculares.

Esses dados sugerem que pacientes com AI sem etiologia molecular definida devem ser encaminhados para avaliação nefrológica. Da mesma forma, pacientes com doenças renais hereditárias devem ser encaminhados para avaliação odontológica.

Apesar disso, a literatura ainda carece de evidências sobre a fisiopatologia das formas sindrômicas de AI ligadas a doenças renais hereditárias, e a ampliação de relatos de casos com identificação das variantes patogênicas e estudos funcionais devem ser realizados para melhor compreensão dos mecanismos e da etiologia molecular dessas condições.

3 METODOLOGIA

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/FS – UnB), com o registro de número 43064320.3.0000.0030 (Anexo I). A inclusão dos participantes no trabalho só foi feita após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II).

3.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Os exames clínico e complementares dos pacientes foram realizados no Centro de Atendimento Odontológico a Doenças Raras, Unidade de Saúde Bucal, Hospital Universitário de Brasília.

A anamnese incluiu registro de história de trauma, fatores ambientais, sistêmicos e histórico familiar para investigação da etiologia dos defeitos de desenvolvimento do esmalte. O exame físico intraoral e exames de imagens odontológicas (radiografias panorâmicas da face e tomografia computadorizada de feixe cônico) incluíram principalmente a análise de atividade de doença cárie, saúde periodontal, calcificações pulpare, cronologia de erupção dentária e registro dos defeitos de desenvolvimento do esmalte, analisando o aspecto do esmalte, a localização e a forma dos defeitos presentes nas dentições decídua e permanente.

A avaliação nefrológica foi feita no serviço de Nefrologia Pediátrica do Hospital Universitário de Brasília por meio de exames laboratoriais bioquímicos e ultrassonografias.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram coletados 4 ml de sangue venoso dos pacientes casos índices em tubo com EDTA. A extração de DNA foi feita pelo método salting out [36] – Método Puregene, seguido da sua quantificação no Nanovue Plus (GE®) e Qubit.

3.3 SEQUENCIAMENTO SANGER

Na família 1, o diagnóstico molecular do caso índice e da mãe foi realizado por sequenciamento Sanger. O DNA extraído foi utilizado como substrato para amplificação do gene candidato CA2, utilizando-se pares de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1). 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 platinum DNA polimerase (Invitrogen®), tampão de reação e cloreto de magnésio fornecido e usado conforme recomendado pelo fabricante, resultando em um volume final de 50 µl. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. Waltham, MA). Os produtos da amplificação foram purificados e enviados para realização de sequenciamento Sanger (BPI Biotecnologia®, Botucatu, São Paulo, Brasil).

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação e sequenciamento do gene CA2.

CA2	Primers	Amplicon (pb)
Éxon 1	5'-GTCACCACCTCCCCTTGTC-3'	335
	3'-CGGTAAACAGCATGTGCG-5'	
Éxon 2	5'-GGTCTGGGTGTACCTTTCCC-3'	322
	3'-TGGCTCCTTCCATTAAGCTC-5'	
Éxon 3	5'-AGGCATGTGTTTCATGTGTG-3'	329
	3'-TTCACTGGGCGTGAGTTG-5'	
Éxon 4	5'-GACCATTGAATAAAATCTGTCAGC-3'	242
	3'-TCCTGTATGTTACAAATACTCTGTCTG-5'	
Éxon 5	5'-AGTGGAGAATTTGGGCTCAC-3'	301
	3'-AACTGCTCATCCAAACACCAC-5'	
Éxon 6	5'-TGTGTCTGCTGCTCTCCTACC-3'	295
	3'-CCAAGGTCTTCTGCCTTGAC-5'	
Éxon 7	5'-CATGCCTCAGCCTTACAAAG-3'	327
	3'-TCTGTGCTTAGCTAAAGGGAAAC-5'	

pb: pares de base.

3.3 SEQUENCIAMENTO DE EXOMA

O diagnóstico molecular do caso índice da família 2 foi feito por sequenciamento de exoma. Após a extração de DNA, a quantificação foi realizada inicialmente por meio da preparação de um mix (por amostra), de Qubit buffer (199 µl) e Qubit reagente (1 µl). A padronização do aparelho foi realizada por meio de 10 µl de Standart + 190 µl do mix. Após esse procedimento, iniciou-se a quantificação com 199 µl de mix e 1 µl da amostra. Um total de 10 ng de DNA por amostra foi enviado para sequenciamento de exoma completo (Macrogen®, Seul, Coreia do Sul), na plataforma Illumina HiSeq 4000 com cobertura média de 50 vezes e comprimento de leitura de 2x100 pb.

A interpretação do sequenciamento de exoma foi feita nas plataformas VarStation, Franklin (www.genoox.com) e Varsome (<https://varsome.com/>). Os filtros aplicados para obtenção do conjunto de variantes candidatas causadoras de AI: 1) filtragem baseada em impacto funcional reteve apenas variantes que fossem não sinônimas, sinônimas, frameshift, nonsense, ou que afetassem sítios canônicos doadores/acceptores de splicing; 2) filtros de características fenotípicas dos casos índices foram utilizados; 3) ontologia do fenótipo humano (HPO) com a análise de 31 genes, sendo eles: *ACP4*, *AMBN*, *AMELX*, *AMTN*, *CLDN19*, *CNNM4*, *DLX3*, *DNAJC21*, *ENAM*, *FAM20A*, *FAM83H*, *GPR68*, *ITGB6*, *KLK4*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LTBP3*, *MMP20*, *ODAPH*, *ORAI1*, *PEX1*, *RELT*, *ROGDI*, *SATB1*, *SLC10A7*, *SLC13A5*, *SLC24A4*, *SMARCD2*, *STIM1*, *TMEM165* e *WDR72*.

As variantes classificadas como melhores candidatas na análise do exoma foram visualizadas no Software Integrative Genomics Viewer (IGV) (Broad Institute of MIT and Harvard). A classificação de todas as variantes foi realizada de acordo com as orientações da American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [38].

4 RESULTADOS

4.1 FAMÍLIA 1 – PACIENTE III:1

Paciente do sexo feminino, 24 anos, filha única de pais não consanguíneos. Aos 8 anos foi diagnosticada clinicamente com deficiência de CAII, apresentando osteopetrose e acidose tubular renal, sendo encaminhada pelo serviço de Nefrologia Pediátrica do HUB para avaliação odontológica. Não há outro membro afetado na família (Figura 2).

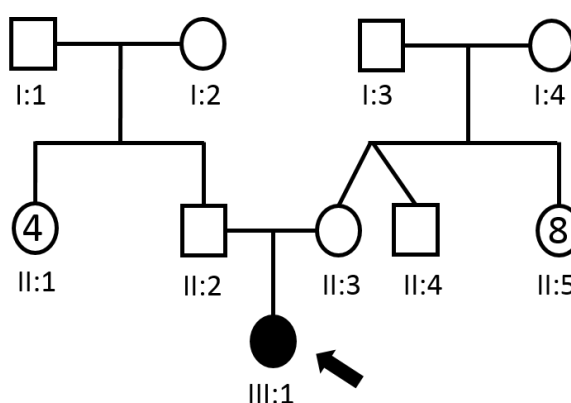


Figura 2. Heredograma da família 1. Não houve relato de consanguinidade ou de outro membro afetado na família.

A paciente possui baixa estatura, calcificações cerebrais com retardo mental, dismorfismos faciais, osteopetrose, histórico de fraturas com difícil consolidação de fêmur, tíbia e fíbula, atrofia do nervo óptico direito, nistagmo horizontal e perda auditiva leve bilateral.

Ao exame físico intraoral, foi detectada mordida aberta anterior e mordida cruzada posterior. A paciente apresentou gengivite localizada em áreas de difícil acesso para higienização devido à presença de dentes retidos e mal posicionados. Observou-se apinhamento dentário, dentes inclusos, retenção prolongada de dentes decíduos e AI hipoplásica com pontos e depressões afetando ambas as dentições decídua e permanente (Figura 3).

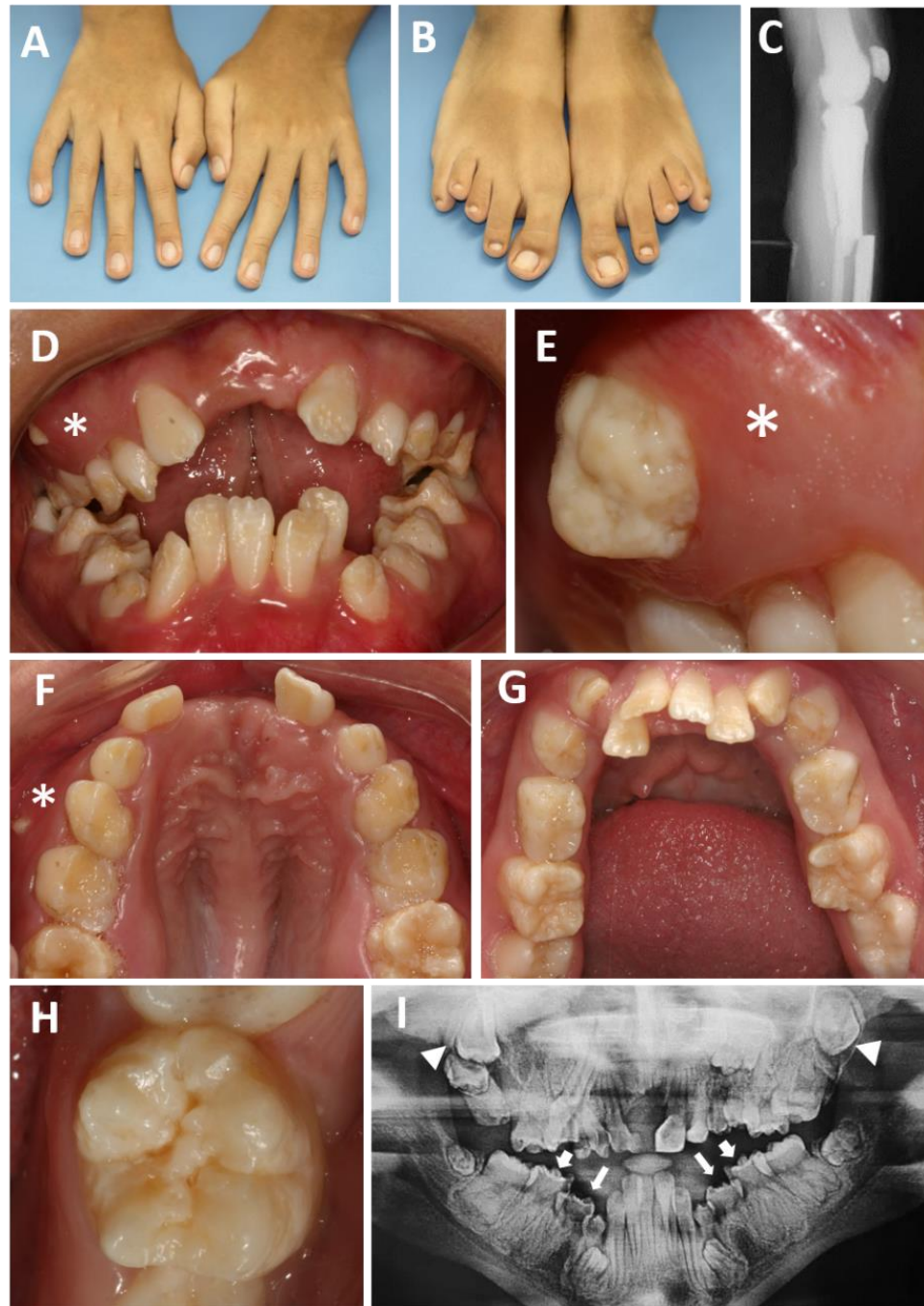


Figura 3. Aspectos clínicos e radiográficos do caso índice da família 1. (A-B) O exame físico extraoral revelou deformidade esquelética e clinodactilia nos dedos das mãos e pés. (C) Radiografia de membro inferior evidencia fratura de tíbia e fíbula. (D) Nota-se a presença de mordida aberta anterior, gengivite localizada e apinhamento dentário. (E) Dente 14 com erupção ectópica apresentando hipoplasias de esmalte. (F-G) Vista oclusal demonstra palato profundo e atrésico na maxila e apinhamento com retenção prolongada dos segundos molares decíduos na mandíbula. (H) Dente 36 com hipoplasias de esmalte na forma de pontos e alteração da forma. (I) Radiografia panorâmica evidencia distúrbios da erupção, com a presença de dentes retidos e inclusos (triângulos), e alteração na espessura do esmalte de molares decíduos e permanentes (setas).

Os exames bioquímicos demonstraram a presença de acidose metabólica com hipercalcúria e hipocitratúria (Tabela 2). A hipocitratúria foi controlada com citrato de potássio e, nos dias atuais, a paciente está sob uso de hidroclorotiazida e bicarbonato de sódio para o controle da hipercalcúria e acidose metabólica. A ultrassonografia dos rins não evidenciou nefrocalcinose. A paciente se encontra em acompanhamento por uma equipe multidisciplinar.

Tabela 2. Valores dos exames bioquímicos da paciente caso índice da família 1.

	Caso índice	Valores de referência
Gasometria venosa		
pH	7.21 (↓)	7.35 - 7.45
HCO ₃ (mEq/l)	16.7 (↓)	22.0 - 26.0
BE (mmol/l)	-10.5 (↓)	-3 a +3
EAS		
pH	6.0 (↑)	5.0 - 5.7
Glicosúria	Negativo (N)	Negativo
Urina de 24h		
Calciúria (mg/kg/dia)	5.4 (↑)	< 4.0
Citratúria (mmol/24h)	0.32 (↓)	0.90 - 2.70

HCO₃: bicarbonato; BE: base excess; EAS: Elementos Anormais do Sedimento; mEq/l: miliequivalente por litro; mmol/l: milimol por litro; mg/kg/dia: miligrama por quilograma por dia; mmol/24h: milimol por 24 horas; (↓): valor abaixo da referência; (↑): valor acima da referência; (N): normalidade.

O sequenciamento Sanger identificou a variante CA2: c.753delG, no éxon 7, em heterozigose na mãe (II:3) e homozigose no caso índice (III:1), causando o frameshift p.Asn252Thrfs*14 (Figura 4). Não foi possível realizar o sequenciamento no pai (II:2). A variante foi classificada como provavelmente patogênica, recebendo códigos PM2, PVS1 e PP4, de acordo com a classificação da American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG).

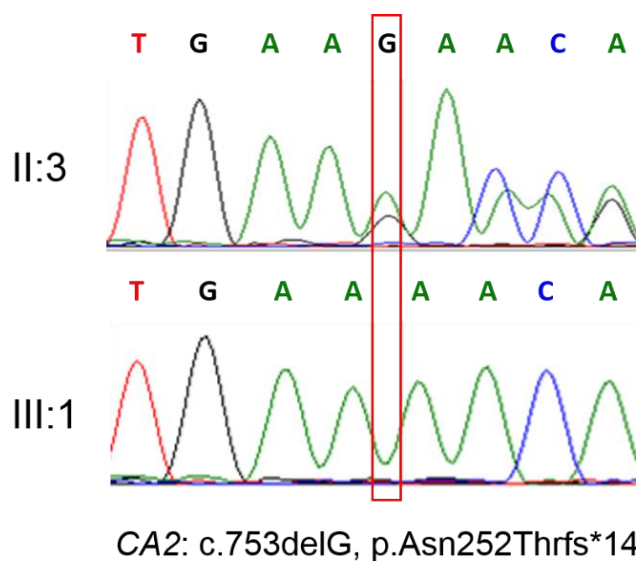


Figura 4. Cromatogramas evidenciam deleção da guanina 753 no gene *CA2* em heterozigose na mãe (II:3) e homozigose no caso índice da família 1 (III:1), com substituição da asparagina 252 por uma treonina e ocorrência de frameshift.

O relato de caso desta paciente foi apresentado na 39^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO) (Anexo III) e publicado no periódico internacional *Intractable & Rare Diseases Research* (Qualis A2) (Anexo IV).

4.2 FAMÍLIA 2 – PACIENTE III:2

Paciente do sexo masculino, 18 anos, compareceu ao Centro de Atendimento Odontológico a Doenças Raras do HUB com queixa principal de dentes que não nasciam. Não houve relato de consanguinidade e a identidade do pai é desconhecida (Figura 5). Não foi registrada nenhuma alteração sistêmica ou uso de medicamentos.

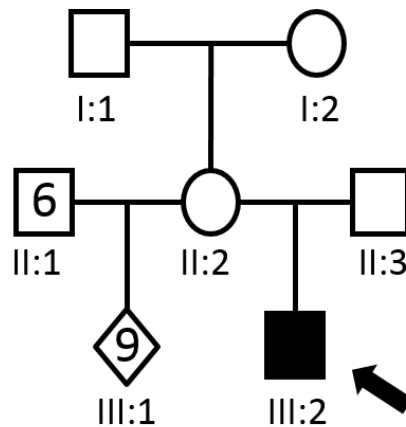


Figura 5. Heredograma da família 2. A identidade do pai do caso índice é desconhecida e não há outro membro afetado na família.

O exame físico intraoral revelou a presença de AI hipoplásica, dentes decíduos e permanentes amarelados, coroas clínicas reduzidas em altura e largura, diastemas, incisivos inferiores com bordas incisais em formato semilunar, aplainamento das faces oclusais de dentes posteriores e fibromatose gengival (Figura 6). Ao exame radiográfico, foi observado retenção prolongada de dentes decíduos, impacção de dentes permanentes, alteração na espessura de esmalte, calcificações intrapulpares, dilacerações radiculares, hiperplasias do folículo pericoronário e radiodensidade similar entre esmalte e dentina. O paciente foi encaminhado para o serviço de Nefrologia, e a avaliação nefrológica evidenciou hipofosfatemia com leve acidose metabólica, sem a presença de nefrocalcinose ou nefrolitíase.

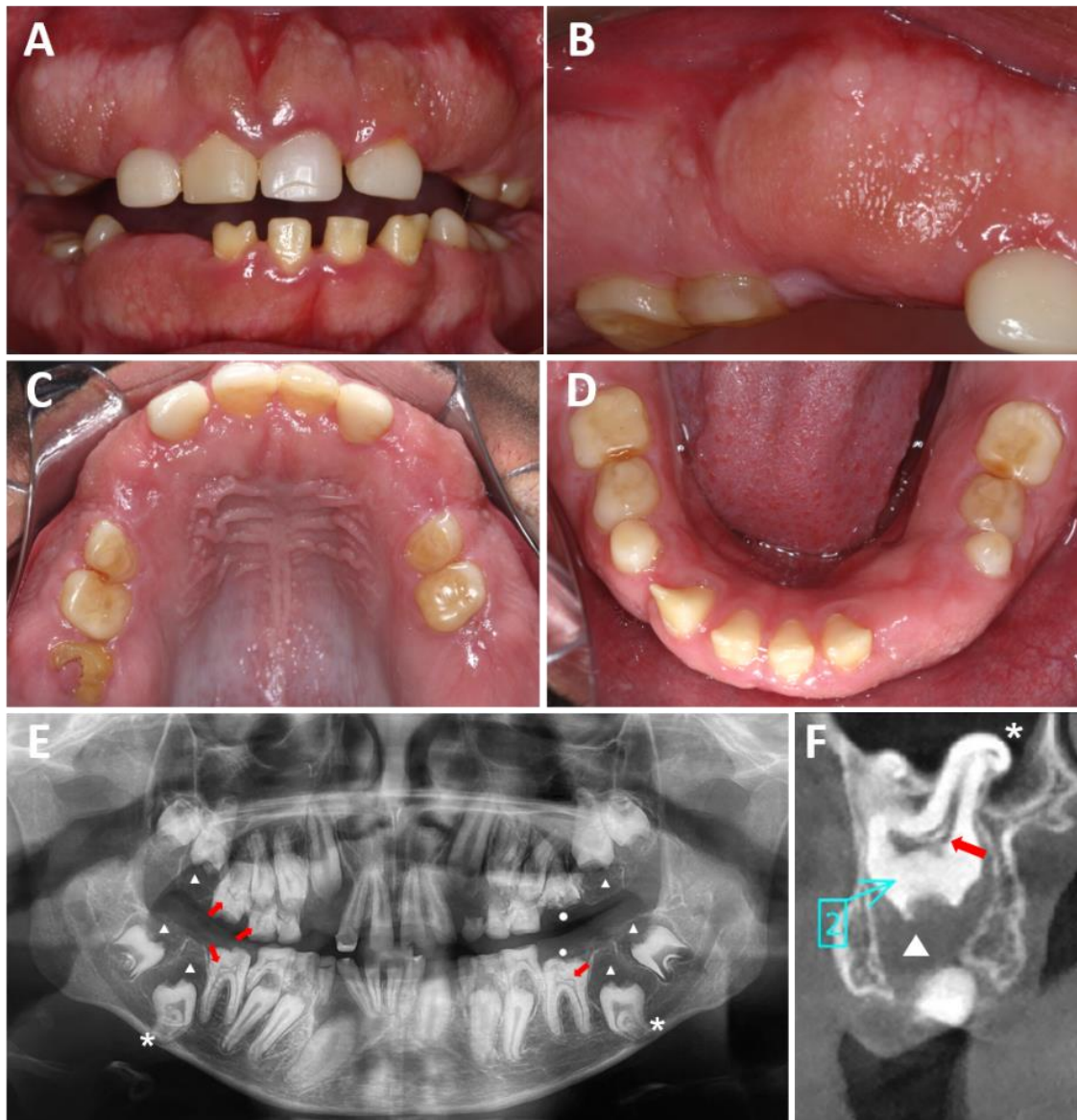


Figura 6. Aspectos clínicos, radiográficos e tomográficos do caso índice da família 2. (A) Vista frontal evidencia descoloração dentária, amelogenese imperfeita hipoplásica e incisivos inferiores em formato semilunar. (B) É possível observar a ausência de dentes permanentes e o aumento tecidual associado à fibromatose gengival. (C-D) Fotografias oclusais da maxila e mandíbula demonstram espaços interproximais aumentados, coroas clínicas reduzidas e aplainamento das faces oclusais de dentes posteriores. (E) Radiografia panorâmica aos 13 anos de idade exibe calcificações intrapulpares (setas), dilacerações radiculares (asteriscos), hiperplasias foliculares pericoronárias (triângulos) e reabsorções coronárias (círculos). (F) Tomografia computadorizada de feixe cônico aos 15 anos de idade, corte parassagital da maxila. Dente 17 com hiperplasia folicular pericoronária (triângulo), calcificação intrapulpar (seta) e dilaceração radicular (asterisco).

O sequenciamento de exoma completo identificou duas variantes em heterozigose composta no gene *FAM20A* (NM_017565.4: c.406C>T, p.Arg136* e NM_017565.4: c.343_362delTCGCTCCTGGCCAGCCAGGA, p.Ser115Glyfs*48) no caso índice, com diagnóstico de ERS e AI hipoplásica sindrômica (Figuras 7 e 8).

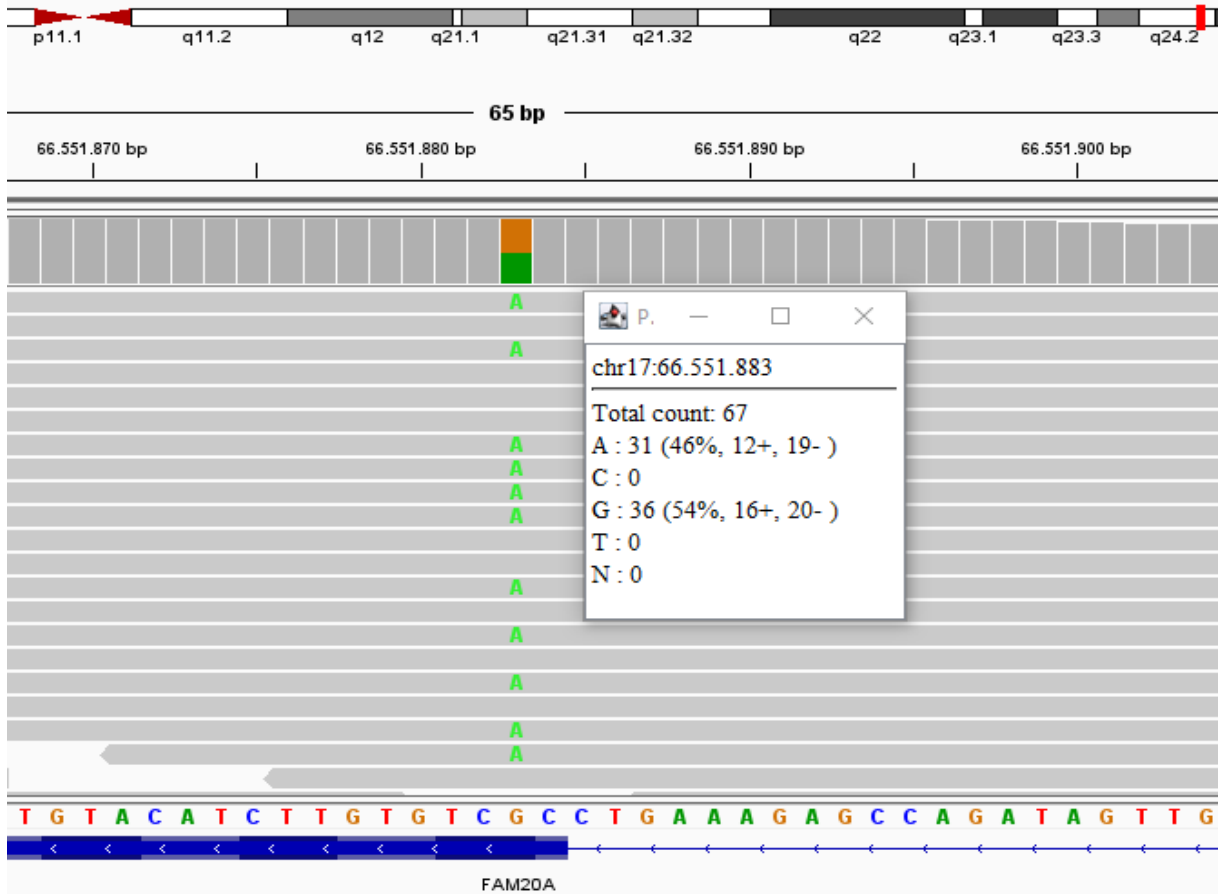


Figura 7. Visualização da variante NM_017565.4:c.406C>T, p.Arg136* no Integrative Genomics Viewer (IGV) para confirmação de resultado de exoma.

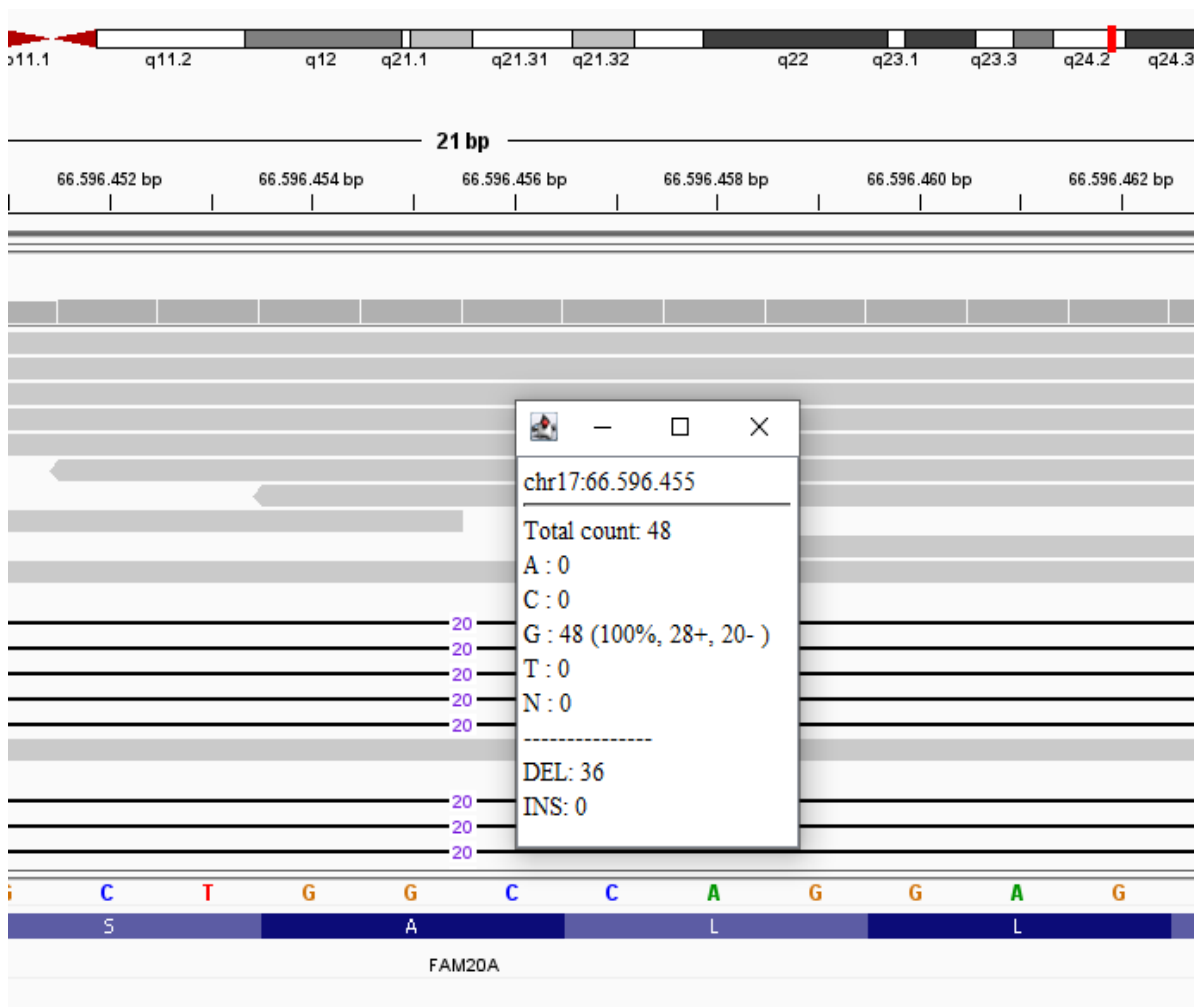


Figura 8. Visualização da variante NM_017565.4: c.343_362delTCGCTCCTGGCCAGCCAGGA, p.Ser115Glyfs*48 no Integrative Genomics Viewer (IGV) para confirmação de resultado de exoma.

A variante NM_017565.4: c.406C>T foi classificada como patogênica de acordo com as orientações da American College of Medical Genetics and Genomics (PVS1, PM2, PP5). A variante NM_017565.4: c.343_362delTCGCTCCTGGCCAGCCAGGA recebeu classificação de provavelmente patogênica, considerando o mesmo método de classificação (PVS1, PM2).

O relato de caso deste paciente foi premiado em primeiro lugar na modalidade Painel Relatos de Casos e Revisões da 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO) (Anexo III).

5 DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização fenotípica e genotípica de dois pacientes de duas famílias distintas com diagnóstico de AI autossômica recessiva sindrômica. Ambos os pacientes apresentaram hipoplasias de esmalte generalizadas nas dentições decídua e permanente.

A paciente caso índice da família 1 apresentou os achados clássicos da síndrome da deficiência de CAII, exceto pela ausência de nefrocalcinose e a presença de AI hipoplásica, que não havia sido relatada nesta síndrome. A mesma variante detectada no gene *CA2* já havia sido relatada em dois irmãos mexicanos [39]. No entanto, o fenótipo orodental não foi caracterizado neste estudo.

A síndrome da deficiência de CAII apresenta uma distribuição geográfica específica, com a maioria dos casos provenientes da região do Oriente Médio, i.e. pacientes de descendência árabe, provavelmente devido à alta taxa de casamentos consanguíneos nessa população [10,40]. Na família 1, não houve relato de consanguinidade, mas, uma vez que os pais são de uma pequena cidade com população reduzida, a possibilidade de semelhanças genéticas entre eles pode ser considerada para explicar a homoziguidade detectada pelo exame molecular.

Foi feita uma busca na literatura em três bases de dados (Medline, PubMed e Web of Science) em julho de 2023, incluindo os seguintes termos: “CAII deficiency or carbonic anhydrase 2” AND “oral manifestations OR enamel”. Após a remoção de duplicatas e estudos em língua estrangeira, um total de 309 estudos foram recuperados [41].

Após as leituras dos resumos, 60 estudos foram selecionados para a próxima fase. Foi feita a leitura completa e apenas quatro relatos de caso [42-45] e uma série de casos [10] descreveram hipoplasias de esmalte em pacientes com síndrome da deficiência de CAII. Entre estes estudos, apenas um confirmou a etiologia molecular da doença e descreveu a presença de hipoplasias de esmalte em três pacientes de duas famílias distintas [42]. Em nenhum estudo houve relato de AI.

O fenótipo renal de modelos animais transgênicos *Car2* (-/-) é semelhante ao observado em pacientes humanos afetados, i. e. acidose metabólica e falha na acidificação urinária, mas ainda não há descrição sobre o fenótipo orodental [46]. A paciente do presente trabalho apresentou AI hipoplásica afetando a dentição decídua e permanente. Como o desenvolvimento do esmalte dos dentes decíduos ocorre no período pré-natal, quando a nutrição fetal ocorre pelo suprimento

sanguíneo materno, pode-se deduzir que é improvável que DDE em dentes decíduos sejam causados por distúrbios sistêmicos em pacientes nascidos de gestações sem complicações [47]. No entanto, DDE também podem ser causados por outros fatores como infecções locais, trauma dental e distúrbios ambientais. Assim, um efeito secundário da acidose metabólica nos DDE encontrados na paciente não pode ser descartado, uma vez que os ameloblastos são sensíveis a mudanças de pH.

O papel da CAII na amelogênese só foi descrito nos últimos anos [7-9], e isso pode explicar o motivo de o fenótipo do esmalte nos pacientes afetados não ter sido criteriosamente caracterizado em estudos prévios. Além do mais, no passado, a AI costumava ser classificada apenas como um traço isolado causado por variantes em genes que codificam proteínas da matriz do esmalte ou proteases. Entretanto, avanços nas técnicas de diagnóstico molecular já identificaram variantes causativas em pelo menos 26 genes diferentes ligados a 19 tipos de AI sindrômica [1], e o conhecimento sobre a doença tem aumentado.

Na família 2, o diagnóstico foi de ERS, uma síndrome rara caracterizada por manifestações oro-dentais patognomônicas, que incluem: AI hipoplásica, fibromatose gengival, hiperplasia do folículo pericoronário, calcificações gengivais, calcificações intrapulpares, atraso na erupção dentária e reabsorções coronárias de dentes impactados [13,14]. Geralmente, os pacientes também apresentam nefrocalcinose associada.

Uma das variantes detectadas no caso índice da família 2 (NM_017565.4: c.406C>T, p.Arg136*) já havia sido relatada em três estudos prévios [48-50]. Já a segunda variante (NM_017565.4: c.343_362delTCGCTCCTGGCCAGCCAGGA, p.Ser115Glyfs*48) não foi previamente relatada na literatura.

A ERS foi descrita pela primeira vez em 1972 por MacGibbon em 2 pacientes da mesma família com hipoplasias de esmalte generalizadas e nefrocalcinose [51]. Um deles faleceu devido ao quadro de insuficiência renal. Ao longo dos anos, em casos com ausência de nefrocalcinose, a condição foi denominada como Síndrome da Amelogênese Imperfeita e Fibromatose Gengival (AIGFS) [50]. No entanto, estudos moleculares identificaram que ambas as síndromes, AIGFS e ERS, são causadas por variantes causativas no gene *FAM20A* e se tratam da mesma condição, porém com uma variabilidade fenotípica [13,14].

O paciente com ERS deste trabalho não apresentou nefrocalcinose. No entanto, não se descarta a possibilidade de que futuramente o paciente possa

apresentar calcificações no parênquima renal. Por isso, é importante que seja feito acompanhamento periódico a fim de se realizar um diagnóstico precoce com melhor prognóstico do caso.

A proteína FAM20A (family with sequence similarity 20, member A) é uma pseudoquinase da via secretora do Complexo de Golgi envolvida no processo de biomineralização no esmalte dentário e em diferentes tecidos, sendo expressa em matrizes extracelulares dentárias e fibroblastos gengivais [52]. A família FAM20 é composta pelas proteínas FAM20A, FAM20B e FAM20C. Estudos em modelo animal demonstraram a expressão dos genes *Fam20a* e *Fam20c* em ameloblastos e odontoblastos [53-56].

Ainda não há um protocolo de tratamento definido para pacientes com ERS, mas cabe ressaltar a importância da avaliação odontológica para o diagnóstico, uma vez que as manifestações oro-dentais constituem os primeiros sinais da doença e as alterações renais são silenciosas inicialmente. Quando os pacientes com suspeita de ERS não são encaminhados ao nefrologista, o diagnóstico renal tardio leva à insuficiência renal, com pior prognóstico do caso, ressaltando a importância do trabalho multiprofissional no manejo desses pacientes.

6 CONCLUSÕES

As hipoplasias de esmalte generalizadas observadas na dentição decídua e permanente da paciente da família 1 indicam que a AI faz parte do espectro fenotípico da síndrome da deficiência de CAII. Por isso, sugere-se que esta síndrome deve ser incluída no grupo de doenças renais autossômicas recessivas ligadas a AI sindrômica. Esses resultados ressaltam a importância de se encaminhar pacientes com doenças renais autossômicas recessivas para avaliação odontológica. Da mesma forma, pacientes com AI devem ser encaminhados para avaliação nefrológica. Além disso, a nova variante do paciente da família 2 amplia o espectro de variantes causativas no gene *FAM20A*, aumentando o conhecimento da etiologia da ERS.

REFERÊNCIAS

1. Dong J, Ruan W, Duan X. Molecular-based phenotype variations in amelogenesis imperfecta. *Oral Diseases*. 2023;29(6):2334–65. doi:10.1111/odi.14599
2. Smith CE, Poulter JA, Antanaviciute A, Kirkham J, Brookes SJ, Inglehearn CF, et al. Amelogenesis imperfecta; genes, proteins, and pathways. *Frontiers in Physiology*. 2017;8. doi:10.3389/fphys.2017.00435
3. Whyte MP. Carbonic anhydrase II deficiency. *Bone*. 2023;169:116684. doi:10.1016/j.bone.2023.116684
4. Borthwick KJ. A phenocopy of CAII deficiency: A novel genetic explanation for inherited infantile osteopetrosis with distal renal tubular acidosis. *Journal of Medical Genetics*. 2003;40(2):115–21. doi:10.1136/jmg.40.2.115
5. Purkerson JM, Schwartz GJ. The role of Carbonic anhydrases in renal physiology. *Kidney International*. 2007;71(2):103–15. doi:10.1038/sj.ki.5002020
6. Fathallah DahmaniM, Bejaoui M, Sly WilliamS, Lakhoua R, Dellagi K. A unique mutation underlying carbonic anhydrase II deficiency syndrome in patients of Arab descent. *Human Genetics*. 1994;94(5). doi:10.1007/bf00211035
7. Bori E, Guo J, Rácz R, Burghardt B, Földes A, Kerémi B, et al. Evidence for bicarbonate secretion by ameloblasts in a novel cellular model. *Journal of Dental Research*. 2016;95(5):588–96. doi:10.1177/0022034515625939
8. Yin K, Paine ML. Bicarbonate transport during enamel maturation. *Calcified Tissue International*. 2017;101(5):457–64. doi:10.1007/s00223-017-0311-2
9. Lin HM, Nakamura H, Noda T, Ozawa H. Localization of H⁺-ATPase and carbonic anhydrase II in ameloblasts at maturation. *Calcified Tissue International*. 1994;55(1):38–45. doi:10.1007/bf00310167
10. Awad M, Al-Ashwal AA, Sakati N, Al-Abbad AA, Bin-Abbas BS. Long-term follow up of carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Saudi Medical Journal*. 23(1):25–9.
11. Pang Q, Qi X, Jiang Y, Wang O, Li M, Xing X, et al. Two novel CAII mutations causing carbonic anhydrase II deficiency syndrome in two unrelated Chinese families. *Metabolic Brain Disease*. 2015;30(4):989–97. doi:10.1007/s11011-015-9660-6
12. Alsemari A, Alsuhaibani M, Alhathloul R, Ali BM. Potential oligogenic disease of mental retardation, short stature, spastic paraparesis and osteopetrosis. *The*

- Application of Clinical Genetics. 2018;Volume 11:129–34. doi:10.2147/tacg.s172176
13. de la Dure-Molla M, Quentric M, Yamaguti P, Acevedo A-C, Mighell AJ, Vikkula M, et al. Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2014;9(1):84. doi:10.1186/1750-1172-9-84
 14. Dourado MR, dos Santos CR, Dumitriu S, Iancu D, Albanyan S, Kleta R, et al. Enamel renal syndrome: A novel homozygous FAM20A founder mutation in 5 new Brazilian families. *European Journal of Medical Genetics*. 2019;62(11):103561. doi:10.1016/j.ejmg.2018.10.013
 15. Kantaputra PN, Bongkochwilawan C, Kaewgahya M, Ohazama A, Kayserili H, Erdem AP, et al. Enamel-renal-gingival syndrome, Hypodontia, and a novel FAM20A mutation. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2014;164(8):2124–8. doi:10.1002/ajmg.a.36579
 16. Nanci A. *Ten cate histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2019.
 17. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental Enamel Formation and implications for Oral Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2017;97(3):939–93. doi:10.1152/physrev.00030.2016
 18. Simmer JP, Hu JC-C, Hu Y, Zhang S, Liang T, Wang S-K, et al. A genetic model for the secretory stage of Dental Enamel Formation. *Journal of Structural Biology*. 2021;213(4):107805. doi:10.1016/j.jsb.2021.107805
 19. Pandya M, Diekwisch TGH. Amelogenesis: Transformation of a protein-mineral matrix into tooth enamel. *Journal of Structural Biology*. 2021;213(4):107809. doi:10.1016/j.jsb.2021.107809
 20. Smith CE, Warshawsky H. Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor. evidence for ameloblast death immediately after enamel matrix secretion. *The Anatomical Record*. 1977;187(1):63–97. doi:10.1002/ar.1091870106
 21. Simmer JP, Hu JC. Dental Enamel Formation and its impact on clinical dentistry. *Journal of Dental Education*. 2001;65(9):896–905. doi:10.1002/j.0022-0337.2001.65.9.tb03438.x
 22. Warshawsky H, Smith CE. Morphological classification of rat incisor ameloblasts. *The Anatomical Record*. 1974;179(4):423–45. doi:10.1002/ar.1091790403
 23. Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: From health to disease.

- Journal of Dental Research. 2005;84(1):9–20. doi:10.1177/154405910508400102
24. Fehrenbach MJ, Popowics T. Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e das Estruturas Orofaciais. 5. ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN; 2022.
25. Backman B, Holm A-K. Amelogenesis imperfecta: Prevalence and incidence in a northern Swedish county. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 1986;14(1):43–7. doi:10.1111/j.1600-0528.1986.tb01493.x
26. Chosack A, Eidelman E, Wisotski I, Cohen T. Amelogenesis imperfecta among Israeli Jews and the description of a new type of local hypoplastic autosomal recessive amelogenesis imperfecta. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1979;47(2):148–56. doi:10.1016/0030-4220(79)90170-1
27. Rao S, Witkop CJ. Inherited defects in tooth structure. *Birth Defects Original Article Series*. 1971;7(7):153–84.
28. Witkop CJ. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: Problems in classification. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 1988;17(9–10):547–53. doi:10.1111/j.1600-0714.1988.tb01332.x
29. Aldred M, Crawford P. Amelogenesis imperfecta-towards a new classification. *Oral Diseases*. 1995;1(1):2–5. doi:10.1111/j.1601-0825.1995.tb00148.x
30. Wright JT. Enamel phenotypes: Genetic and environmental determinants. *Genes*. 2023;14(3):545. doi:10.3390/genes14030545
31. Bloch-Zupan A, Rey T, Jimenez-Armijo A, Kawczynski M, Kharouf N, Dure-Molla M de, et al. Amelogenesis imperfecta: Next-generation sequencing sheds light on Witkop's classification. *Frontiers in Physiology*. 2023;14. doi:10.3389/fphys.2023.1130175
32. Marchewka J, Skrzat J, Wróbel A. Analysis of the enamel hypoplasia using micro-CT scanner versus classical method. *Anthropologischer Anzeiger*. 2014;71(4):391–402. doi:10.1127/0003-5548/2014/0366
33. Hu JC-C, Chun Y-HP, Al Hazzazzi T, Simmer JP. Enamel Formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs*. 2007;186(1):78–85. doi:10.1159/000102683
34. Kim J, Simmer JP, Lin BP -L., Seymen F, Bartlett JD, Hu JC -C. Mutational analysis of candidate genes in 24 amelogenesis imperfecta families. *European Journal of Oral Sciences*. 2006;114(s1):3–12. doi:10.1111/j.1600-0722.2006.00278.x
35. Chan H, Estrella NM, Milkovich RN, Kim J, Simmer JP, Hu JC. Target gene

- analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds. *European Journal of Oral Sciences*. 2011;119(s1):311–23. doi:10.1111/j.1600-0722.2011.00857.x
36. Amorim BR, dos Santos PA, de Lima CL, Andia DC, Mazzeu JF, Acevedo AC. Protocols for genetic and epigenetic studies of rare diseases affecting dental tissues. *Methods in Molecular Biology*. 2019;453–92. doi:10.1007/978-1-4939-9012-2_37
37. Yamaguti, PM. Manifestações bucais de pacientes com doenças renais hereditárias e nefrocalcinose e análise de variação de seqüência de pacientes com amelogênese imperfeita e FHHNC. 2012. xiii, 82 f., il. Tese(Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília.
38. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015;17(5):405–24. doi:10.1038/gim.2015.30
39. Hu PY, Lim EJ, Ciccolella J, Strisciuglio P, Sly WS. Seven novel mutations in carbonic anhydrase II deficiency syndrome identified by SSCP and direct sequencing analysis. *Human Mutation*. 1999 Jan 7;9(5):383–7. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:5<383::AID-HUMU1>3.0.CO;2-5
40. Sly WS, Whyte MP, Sundaram V, Tashian RE, Hewett-Emmett D, Guibaud P, et al. Carbonic anhydrase II deficiency in 12 families with the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *New England Journal of Medicine*. 1985;313(3):139–45. doi:10.1056/nejm198507183130302
41. Leite LDR, Resende KKM, Rosa LS, Mazzeu JF, Oliveira LC, Scher MCSD, Acevedo AC, Yamaguti PM. Carbonic anhydrase II deficiency syndrome with amelogenesis imperfecta linked to a homozygous CA2 deletion. *Intractable & Rare Diseases Research*. 2023;12(3):202–5. doi:10.5582/irdr.2023.01033
42. Ismail EA, Abul Saad S, Sabry MA. Nephrocalcinosis and urolithiasis in carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *European Journal of Pediatrics*. 1997;156(12):957–62. doi:10.1007/s004310050751
43. Ohlsson A, Stark G, Sakati N. Marble brain disease: Recessive osteopetrosis, renal tubular acidosis and cerebral calcification in three Saudi Arabian families. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2008;22(1):72–84.

- doi:10.1111/j.1469-8749.1980.tb04307.x
44. Strisciuglio P, Sartorio R, Pecoraro C, Lotito F, Sly WS. Variable clinical presentation of carbonic anhydrase deficiency: Evidence for heterogeneity? *European Journal of Pediatrics*. 1990;149(5):337–40. doi:10.1007/bf02171561
 45. Nagai R, Kooh SW, Balfe JW, Fenton T, Halperin ML. Renal tubular acidosis and osteopetrosis with carbonic anhydrase II deficiency: Pathogenesis of impaired acidification. *Pediatric Nephrology*. 1997;11(5):633–6. doi:10.1007/s004670050354
 46. Hains DS, Chen X, Saxena V, Barr-Beare E, Flemming W, Easterling R, et al. Carbonic anhydrase 2 deficiency leads to increased pyelonephritis susceptibility. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014;307(7). doi:10.1152/ajprenal.00344.2014
 47. Koch MJ, Bühner R, Pioch T, Schärer K. Enamel hypoplasia of primary teeth in chronic renal failure. *Pediatric Nephrology*. 1999;13(1):68–72. doi:10.1007/s004670050566
 48. Jaureguiberry G, De la Dure-Molla M, Parry D, Quentric M, Himmerkus N, Koike T, et al. Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive FAM20A mutations. *Nephron Physiology*. 2013;122(1–2):1–6. doi:10.1159/000349989
 49. Wang S-K, Aref P, Hu Y, Milkovich RN, Simmer JP, El-Khateeb M, et al. FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome (ERS). *PLoS Genetics*. 2013;9(2). doi:10.1371/journal.pgen.1003302
 50. O'Sullivan J, Bitu CC, Daly SB, Urquhart JE, Barron MJ, Bhaskar SS, et al. Whole-exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and Gingival hyperplasia syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. 2011;88(5):616–20. doi:10.1016/j.ajhg.2011.04.005
 51. MacGibbon D. Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction. *Australian Dental Journal*. 1972;17(1):61–3. doi:10.1111/j.1834-7819.1972.tb02747.x
 52. Cho SH, Seymen F, Lee KE, Lee SK, Kweon YS, Kim KJ, et al. Novel FAM20A mutations in hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Human Mutation*. 2011;33(1):91–4.
 53. Li L, Saiyin W, Zhang H, Wang S, Xu Q, Qin C, et al. FAM20A is essential for amelogenesis, but is dispensable for dentinogenesis. *Journal of Molecular Histology*. 2019;50(6):581–91. doi:10.1007/s10735-019-09851-x
 54. Li L-L, Liu P-H, Xie X-H, Ma S, Liu C, Chen L, et al. Loss of epithelial FAM20A in

mice causes amelogenesis imperfecta, Tooth Eruption Delay and gingival overgrowth. *International Journal of Oral Science*. 2016;8(2):98–109. doi:10.1038/ijos.2016.14

55. Wang X, Hao J, Xie Y, Sun Y, Hernandez B, Yamoah AK, et al. Expression of FAM20C in the osteogenesis and Odontogenesis of mouse. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2010;58(11):957–67. doi:10.1369/jhc.2010.956565
56. Wang SK, Reid BM, Dugan SL, Roggenbuck JA, Read L, Aref P, et al. FAM20A mutations associated with enamel renal syndrome. *Journal of Dental Research*. 2013;93(1):42–8. doi:10.1177/0022034513512653

ANEXOS

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS CLÍNICOS E GENÉTICOS DE PACIENTES COM AMELOGÊNESE IMPERFEITA NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA

Pesquisador: Ana Carolina Acevedo Poppe

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 43064320.3.0000.0030

Instituição Proponente: FACULDADE DE SAÚDE - FS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.766.613

Apresentação do Projeto:

Conforme "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1661610.pdf", postado em 17/05/2021:

Resumo: "Amelogênese Imperfeita (AI) é um grupo de condições hereditárias, que afetam a qualidade e/ou quantidade do esmalte dentário, podendo estar ou não associada a outras alterações sistêmicas (CRAWFORD et al, 2007). O objetivo geral do projeto é caracterizar as alterações dentárias e bucais dos pacientes diagnosticados com AI sindrômicas e não sindrômicas em atendimento na Clínica de Anomalias Dentárias do Hospital Universitário de Brasília assim como identificar variantes patogênicas pelo método de sequenciamento de nova geração e Sanger."

Hipótese nula: "O uso de sequenciamento de nova geração auxiliará o diagnóstico molecular de pacientes com amelogênese imperfeita e permitirá fazer correlação fenótipo-genótipo."

Metodologia Proposta: "Todos os pacientes que concordarem em participar deste estudo assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Avaliação clínica odontológica: A avaliação e acompanhamento odontológico dos pacientes com AI e seus familiares (pais, irmãos, filhos, tios, primos e/ou avós) serão realizados na Clínica de Atendimento a Pacientes Portadores de

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde

Campus Universitário Darcy Ribeiro – Asa Norte – Brasília-DF CEP : 70910-900

Pág. 1/3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto **“Aspectos clínicos e genéticos de pacientes com Amelogênese Imperfeita no Hospital Universitário de Brasília”**. O objetivo desta pesquisa é estudar os aspectos clínicos e genéticos das alterações encontradas nos seus dentes e a sua participação é muito importante.

O (A) Senhor (a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo (a).

A sua participação ocorrerá por meio da realização de exames clínicos, laboratoriais e consulta ao prontuário do dependente participante da pesquisa. Os exames laboratoriais serão realizados a partir da coleta de sangue para extração de DNA. O procedimento de coleta de 4 a 8 mL de sangue por punção venosa (introdução de agulha na veia para retirada de sangue) será realizado com material estéril descartável de boa qualidade por profissional habilitado, podendo ocasionar um pouco de dor e formação de hematoma no local. A coleta está prevista para uma única vez, mas poderão ser necessárias outras coletas a critério médico ou do dentista.

O sangue coletado será utilizado para examinar seu DNA e serve para detectar alterações nos genes que são responsáveis pela ocorrência da sua doença. As informações serão usadas para melhorar o diagnóstico e aconselhamento de pessoas com sua doença genética.

Durante o exame clínico serão observadas as estruturas da sua boca e da sua face. Você também responderá alguns questionários. Se for necessário, serão realizados exames de imagem tais como fotografias radiografias panorâmicas ou de dentes isolados. Os procedimentos do exame clínico são comuns em odontologia, podendo às vezes incomodar um pouco, porém com risco mínimo para a saúde. As avaliações serão interrompidas se você ficar cansado ou indisposto. O exame clínico será feito por profissionais treinados, e nos esforçaremos para evitar e diminuir desconfortos.

Rubrica Participante

Rubrica Pesquisador



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde

Campus Universitário Darcy Ribeiro – Asa Norte – Brasília-DF CEP : 70910-900

Os procedimentos do exame clínico são comuns em odontologia, podendo às vezes incomodar um pouco, porém oferecem risco mínimo para a saúde. O exame físico será feito por profissionais capacitados, sempre supervisionados por professores e/ou pesquisadores. Quando necessário para a investigação de alguma alteração odontológica, poderão ser solicitados exames de imagem como por exemplo radiografias panorâmicas, periapicais, tomografias da boca. A dose de radiação envolvida nos exames radiográficos odontológicos é pequena e dentro dos padrões de segurança. Além disso, o setor de radiologia odontológica do HUB utiliza o exame radiográfico digital que permite a obtenção da imagem de forma mais fácil e rápida e a diminuição das doses de radiação no paciente.

O(a) senhor(a) não será pago por sua colaboração e também não terá nenhum custo com a participação. Caso o(a) senhor(a) tenha gastos diretamente relacionados à pesquisa, como alimentação, transporte e exames, estas despesas serão pagas pelo pesquisador responsável.

Se for necessária a presença de acompanhante, as despesas dele relacionadas à pesquisa também serão pagas pelo pesquisador. O(a) senhor(a) pode se negar a responder questões que lhe deixem constrangido, se recusar a participar de qualquer procedimento e desistir de participar da pesquisa quando quiser, sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Além disso, será garantido atendimento imediato e /ou indenização diante de eventuais danos decorrentes dessa pesquisa, vistas as medidas administrativas e judiciais cabíveis.

Informamos que será oferecida a(o) senhor(a) acompanhamento clínico nas devidas especialidades odontológicas do Hospital Universitário de Brasília, sem que isto lhe cause custos. Também será oferecida consulta de aconselhamento genético no ambulatório de genética do Hospital Universitário de Brasília com a Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sobre a guarda do pesquisador. Em qualquer momento, você poderá ter acesso aos resultados. Você também poderá decidir se quer ou não ter conhecimento do seu resultado. Sempre que desejar receber esclarecimentos antes, durante e depois da pesquisa e quando desejar saber sobre os resultados, entre em contato com a pesquisadora responsável Dra Ana Carolina Acevedo-Poppe pelo telefone (61) 99854-9011.

Rubrica Participante

Rubrica Pesquisador



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências da Saúde

Campus Universitário Darcy Ribeiro – Asa Norte – Brasília-DF CEP : 70910-900

Solicitamos também sua autorização para armazenamento de sua amostra biológica de sangue para possíveis outros estudos futuros em biorrepositório no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília. A amostra apresentará uma codificação alfanumérica e só poderá ser manuseada pelos indivíduos diretamente relacionados com o projeto.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. O(a) senhor(a) pode pedir esclarecimentos e conhecer seus direitos como participante quando desejar, por meio do telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail cefs@unb.br ou cefsunb@gmail.com, horário de atendimento de 10:00hs às 12:00hs e de 13:30hs às 15:30hs, de segunda a sexta-feira. O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, além de identificar os riscos associados à pesquisa; verificar se foram tomadas as medidas necessárias para minimizar tais riscos (físicos, psíquicos, morais, intelectuais, sociais, culturais ou espirituais); identificar os prováveis benefícios que a pesquisa pode gerar e assegurar que os participantes receberão uma adequada descrição e informação dos riscos.

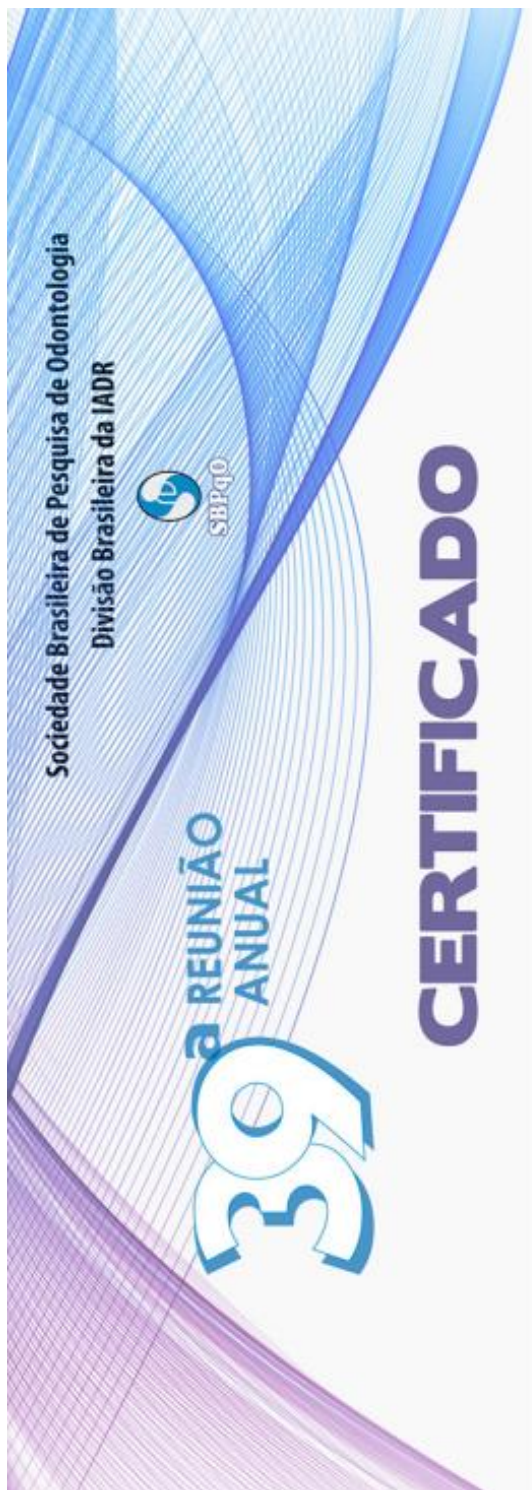
Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com você.

(Assinatura do participante)

Profª. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe

Brasília, _____ de _____ de _____


ANEXO III – CERTIFICADOS DA 39.^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA



Certificamos que o trabalho **PI0365 - AMELOGÊNESE IMPERFEITA, OSTEOPETROSE E ACIDOSE TUBULAR RENAL DISTAL: RELATO DE SÍNDROME RARA CAUSADA POR VARIANTE NO GENE AC2** de Leite LDR*, Resende KKM, Rosa LS, Mazzeu JF, Scher MCSD, Yamaguti PM, Acevedo AC foi apresentado **na modalidade Painel Iniciante**

durante a 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica no período de 07 a 10 de setembro de 2022 no Expo D. Pedro - Campinas


Paulo Francisco César
Presidente


Valentim Adelino Ricardo Barão
Vice-Presidente



Certificamos que o trabalho **RCR125 - SÍNDROME ESMALTE RENAL: RELATO DE NOVAS VARIANTES NO GENE FAM20A** de Resende KKM*, Leite LDR, Rosa LS, Oliveira LC, Mazzeu JF, Yamaguti PM, Acevedo AC **recebeu Primeiro Lugar na modalidade Painel Relatos de Casos e Revisões**

durante a 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica no período de 07 a 10 de setembro de 2022 no Expo D. Pedro - Campinas

Paulo Francisco César
Presidente

Valentim Adelino Ricardo Barão
Vice-Presidente

ANEXO IV – ARTIGO CIENTÍFICO E NORMAS DA REVISTA

Leite LDR, Resende KKM, Rosa LS, Mazzeu JF, Oliveira LC, Scher MCSD, Acevedo AC, Yamaguti PM. **Carbonic anhydrase II deficiency syndrome with amelogenesis imperfecta linked to a homozygous CA2 deletion.** *Intractable & Rare Diseases Research*. 2023;12(3):202–5. doi:10.5582/irdr.2023.01033

Submission guidelines - *Intractable & Rare Diseases Research*

Title page: The title page must include 1) the title of the paper (Please note the title should be short, informative, and contain the major key words); 2) full name(s) and affiliation(s) of the author(s), 3) abbreviated names of the author(s), 4) full name, mailing address, telephone/fax numbers, and e-mail address of the corresponding author; 5) author contribution statements to specify the individual contributions of all authors to this manuscript, and 6) conflicts of interest (if you have an actual or potential conflict of interest to disclose, it must be included as a footnote on the title page of the manuscript; if no conflict of interest exists for each author, please state "There is no conflict of interest to disclose").

Abstract: The abstract should briefly state the purpose of the study, methods, main findings, and conclusions. For articles that are Original Articles, Brief Reports, Reviews, or Policy Forum articles, a one-paragraph abstract consisting of no more than 250 words must be included in the manuscript. For Communications, Editorials, News, or Letters, a brief summary of main content in 150 words or fewer should be included in the manuscript. For articles reporting clinical trials, the trial registration number should be stated at the end of the Abstract. Abbreviations must be kept to a minimum and non-standard abbreviations explained in brackets at first mention. References should be avoided in the abstract. Three to six key words or phrases that do not occur in the title should be included in the Abstract page.

Introduction: The introduction should provide sufficient background information to make the article intelligible to readers in other disciplines and sufficient context clarifying the significance of the experimental findings.

Materials/Patients and Methods: The description should be brief but with sufficient detail to enable others to reproduce the experiments. Procedures that have been published previously should not be described in detail but appropriate references should simply be cited. Only new and significant modifications of previously published procedures require complete description. Names of products and manufacturers with their locations (city and state/country) should be given and sources of animals and cell lines should always be indicated. All clinical investigations must have been conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (as revised in 2013, <https://wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki>). All human and animal studies must have been approved by the appropriate institutional review board(s) and a specific declaration of approval must be made within this section.

Results: The description of the experimental results should be succinct but in sufficient detail to allow the experiments to be analyzed and interpreted by an independent reader. If necessary, subheadings may be used for an orderly presentation. All Figures and Tables should be referred to in the text in order, including those in the Supplementary Data.

Discussion: The data should be interpreted concisely without repeating material already presented in the Results section. Speculation is permissible, but it must be well-founded, and discussion of the wider implications of the findings is encouraged. Conclusions derived from the study should be included in this section.

Acknowledgments: All funding sources (including grant identification) should be credited in the Acknowledgments section. Authors should also describe the role of the study sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source had no such involvement, the authors should so state.

In addition, people who contributed to the work but who do not meet the criteria for authors should be listed along with their contributions.

References: References should be numbered in the order in which they appear in the text. Citing of unpublished results, personal communications, conference abstracts, and theses in the reference list is not recommended but these sources may be mentioned in the text. In the reference list, cite the names of all authors when there are fifteen or fewer authors; if there are sixteen or more authors, list the first three followed by et al. Names of journals should be abbreviated in the style used in PubMed. Authors are responsible for the accuracy of the references. The EndNote Style of Intractable & Rare Diseases Research could be downloaded at EndNote.

Examples are given below:

Example 1 (Sample journal reference):

Inagaki Y, Tang W, Zhang L, Du GH, Xu WF, Kokudo N. Novel aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitor 24F can suppress invasion of hepatocellular carcinoma cells as well as angiogenesis. *Biosci Trends*. 2010; 4:56-60.

Example 2 (Sample journal reference with more than 15 authors):

Darby S, Hill D, Auvinen A, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: Collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 2005; 330:223.

Example 3 (Sample book reference):

Shalev AY. Post-traumatic stress disorder: Diagnosis, history and life course. In: *Post-traumatic Stress Disorder, Diagnosis, Management and Treatment* (Nutt DJ, Davidson JR, Zohar J, eds.). Martin Dunitz, London, UK, 2000; pp. 1-15.

Example 4 (Sample web page reference):

World Health Organization. The World Health Report 2008 – primary health care: Now more than ever. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43949> (accessed September 23, 2022).

Tables: All tables should be prepared in Microsoft Word or Excel and should be arranged at the end of the manuscript after the References section. Please note that tables should not in image format. All tables should have a concise title and should be numbered consecutively with Arabic numerals. If necessary, additional information should be given below the table.

Figure Legend: The figure legend should be typed on a separate page of the main manuscript and should include a short title and explanation. The legend should be concise but comprehensive and should be understood without referring to the text. Symbols used in figures must be explained. Any individually labeled figure parts or panels (A, B, etc.) should be specifically described by part name within the legend.

Figure Preparation: All figures should be clear and cited in numerical order in the text. Figures must fit a one- or two-column format on the journal page: 8.3 cm (3.3 in.) wide for a single column, 17.3 cm (6.8 in.) wide for a double column; maximum height: 24.0 cm (9.5 in.). Please make sure that the symbols and numbers appeared in the figures should be clear. Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF or JPEG) at minimum resolution (600 dpi for illustrations, graphs, and annotated artwork, and 300 dpi for micrographs and photographs). Please provide all figures as separate files. Please note that low-resolution images are one of the leading causes of article resubmission and schedule delays.

Units and Symbols: Units and symbols conforming to the International System of Units (SI) should be used for physicochemical quantities. Solidus notation (e.g. mg/kg, mg/mL, mol/mm²/min) should be used. Please refer to the SI Guide www.bipm.org/en/si/ for standard units.