

VANESSA RADONSKY

**DESAFIO NO DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE PACIENTE COM
NEFROCALCINOSE, HIPERPARATIREOIDISMO E
*AMELOGENESIS IMPERFECTA***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciência

São Paulo

2019

VANESSA RADONSKY

**DESAFIO NO DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE PACIENTE COM
NEFROCALCINOSE, HIPERPARATIREOIDISMO E
*AMELOGENESIS IMPERFECTA***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciência

Área de concentração: Endocrinologia e Metabologia

Orientadora: Dra Marise Lazaretti Castro

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Radonsky, Vanessa

Desafio no diagnóstico genético de paciente com nefrocalcinose, hiperparatireoidismo e *Amelogenesis Imperfecta* /Vanessa Radonsky - São Paulo, 2019.

97p

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Endocrinologia Clínica. Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Título em inglês: Challenge in genetic diagnosis of a patient with nephrocalcinosis, hyperparathyroidism and *amelogenesis imperfecta*

Descritores: 1.Hipercalciúria; 2. Hipomagnesemia; 3.WES; 4. CLDN16; 5. FHHNC

Universidade Federal de São Paulo

Escola Paulista de Medicina

Disciplina de Endocrinologia

Chefe da disciplina: Dra. Maria Teresa Zanella

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Dra. Marise Lazaretti-Castro

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Julienne Angela Ramires de Carvalho

Prof. Dr. Luiz Claudio Gonçalves de Castro

Prof. Dra. Maria Cristina de Andrade

Epílogo

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não
seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como
nos acostumamos ver o mundo”

(Albert Einstein)

Dedicatória

À minha mãe, Lilian, exemplo de dignidade, integridade,
coragem, força e cujo amor e apoio não têm limites.

Ao meu pai, Samuel (*in memoriam*), que sempre me apoiou e me
ensinou valores importantes para toda a vida. Amor eterno.

Ao meu marido, Cleber, pelo incentivo a seguir a trilha do
conhecimento, pelo amor, apoio, atenção e companheirismo.

Às minhas filhas, Letícia e Beatriz, por me
fazerem ser uma pessoa cada vez melhor.

Agradecimento

Primeiramente a Deus por renovar a cada momento minha força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada.

Ao Programa de Pós Graduação em Endocrinologia e Metabologia da UNIFESP, pelo apoio e pela oportunidade de crescimento e aprimoramento acadêmico, pessoal e profissional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marise Lazaretti-Castro, pela oportunidade, confiança depositada, pela valiosa orientação, pela crença zelosa nesta orientanda, pelos ensinamentos passados como médica e como pessoa, e pela amizade que partilhamos.

Ao Dr. Magnus Régio Dias da Silva, pelo incentivo a trilhar esse caminho repleto de novos saberes.

À Dra. Ita Pfeferman Heilberg, pelo seu apoio e instrução nas diversas fases deste trabalho.

Ao Dr. Sergio Setsuo Maeda, pelas suas preciosas considerações e amizade em todos os momentos.

Às Dras. Monique Nakayama Ohe e Elizabete Ribeiro Barros, pelas suas generosas sugestões de aprimoramento.

Às minhas amigas do grupo de metabolismo ósseo, Livia, Naomi, Mariana Adas, Mariana Foroni, Stephanie, Maria Carolina, Debora, pelo convívio, apoio e inúmeros momentos de alegria e amizade.

Aos professores do grupo metabolismo ósseo, Dr. Gilberto e Dra. Cintia, pelas enriquecedoras discussões.

Aos colegas do Laboratório de Endocrinologia Marina, Giba, Maria Clara e Renata pelo auxílio e cooperação nos dias de pesquisa molecular no laboratório.

À Vanda e Geni, pela realização dos exames de densitometria óssea.

Ao paciente que participou deste estudo, junto de sua família, pela disponibilidade e contribuição indispensáveis para realização desta pesquisa.

Agradeço ainda a CAPES pelo apoio concedido para a realização deste trabalho.

Finalmente, meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para a minha jornada acadêmica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO-----	1
Revisão da literatura	
1.1 Nefrocalcinose-----	2
1.1.1 Aspectos gerais sobre Nefrocalcinose-----	2
1.1.2 Nefrocalcinose de causas hereditárias-----	4
1.1.2.1 Síndrome de Bartter-----	4
1.1.2.2 Acidose tubular renal (ATR)	
1.1.2.3 Raquitismo hipofosfatêmico	
1.1.2.4 Hipomagnesemia Familiar com hipercalciúria e nefrocalcinose	
1.1.2.5 Doença de Dent	
1.1.2.6 Síndrome de Lowe	
1.1.2.7 Hiperossalúria primária	
1.1.2.8 Síndrome de William-Beuren	
1.2 Hiperparatireoidismo na infância	
1.2.1 Hiperparatireoidismo primário	
1.2.1.1 Mutação inativadora do CASR	
1.2.1.2 Neoplasia Endócrina Múltipla	
1.2.1.3 Síndrome hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula -	
HPT-JT	
1.2.2 Hiperparatireoidismo Secundário	
1.3 <i>Amelogenesis Imperfecta</i>	
1.4 Uso do exoma para o diagnóstico genético	
2 OBJETIVO	
3 CASO CLÍNICO	
4 ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO	
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	

6 CONCLUSÃO

7 ANEXO

8 APÊNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES

ADHR: raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominante

AE1: trocador iônico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

AGT: glioxilato aminotransferase

AI - amelogenesis imperfecta

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ARDR: raquitismo hipofosfatêmico autossômico recessivo

ATP: adenosina trifosfato

ATR: Acidose tubular renal

BAM: binary alignment/MAP

CaSR: receptor sensor de cálcio

CIC-5: canal de cloro

CNV: copy-number variation.

DMP1: proteína da matriz da dentina 1

ERS - Síndrome esmalte renal

FGF23: fator de crescimento fibroblástico 23

FHH: hipercalcemia hipocalciúrica familiar
FHNNC: hipomagnesemia familiar com hipercalcúria e nefrocalcinose
H⁺ATPase: bomba de H⁺
HPP: hiperparatireoidismo primário
HPT-JT: síndrome hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula
HPTNG: hiperparatireoidismo neonatal grave
MAF: frequência alélica menor
MLPA: amplificação por sonda dependente de ligação múltipla
NC: nefrocalcinose
NEM1: neoplasia endócrina múltipla tipo 1
NEM2A: neoplasia endócrina múltipla tipo 2
NKCC2: co-transportador de sódio-potássio-cloro
NPT2c: cotransportador de sódio fósforo dependente
PCR: reação de cadeia de polimerase
PTH: paratormônio
ROMK1: canal de potássio intraluminal
SNG: Sequenciamento de nova geração
VR: valor de referência
VUS: variante de significado clínico desconhecido
XLH: raquitismo hipofosfatêmico ligado ao X

RESUMO:

Este trabalho descreve os desafios do diagnóstico genético de um menino de 6 anos de idade, encaminhado para o ambulatório de endocrinologia por quadro de hiperparatireoidismo associado a nefrocalcinose. Ele apresentava história de infecções urinária de repetição, polidipsia e poliúria e os exames laboratoriais séricos demonstraram concentrações de cálcio e fósforo normais, PTH elevado e magnésio discretamente reduzido, além de um aumento do cálcio urinário. Nefrocalcinose foi vista na tomografia computadorizada renal. Com o objetivo de otimizar o diagnóstico etiológico considerando vários genes candidatos, optou-se pelo uso da técnica de sequenciamento completo de exoma (WES), que identificou 105.390 variantes entre mutações e polimorfismos, que não justificavam o fenótipo. A principal hipótese diagnóstica seria uma mutação no gene *CLDN16*, responsável pela Hipomagnesemia Familiar com Hiper calciúria e Nefrocalcinose (FHHNC), inicialmente não identificada pelo WES. Entretanto, quando se avaliou o arquivo BAM (binary alignment) para verificar a cobertura de leitura, observou-se a ausência dos exons 2 a 5 do gene *CLDN16*, e a hipótese de grande deleção gênica foi confirmada pelas técnicas de PCR e MLPA. Neste trabalho será apresentada uma revisão de literatura sobre o tema, além de descrever com mais detalhes a FHHNC. A FHHNC é provocada pela mutação dos genes que codificam as proteínas Claudina 16 ou Claudina 19, que são proteínas de adesão para-celular localizadas na porção ascendente da alça de Henle. Estas moléculas sofrem heterodimerização, formando uma barreira para-celular que regula a absorção de cálcio e magnésio. Além de hipomagnesemia, hiper calciúria e nefrocalcinose, que progride para insuficiência renal crônica, costuma estar associado ao hiperparatireoidismo secundário. Recentemente, foi descrita a presença de Amelogenesis imperfecta associada a síndrome, também observada neste paciente. A técnica WES ofereceu grandes avanços no diagnóstico de mutações pontuais, mas ainda apresenta limitações na detecção de grandes deleções ou

duplicações. Este trabalho propiciou um grande aprendizado e acúmulo de conhecimento sobre a interpretação das metodologias de biologia molecular no diagnóstico de doenças endócrinas.

ABSTRACT

This paper describes the challenges of genetic diagnosis of a 6-year-old boy referred to the outpatient clinic of endocrinology for hyperparathyroidism associated with nephrocalcinosis. He had a history of recurrent urinary infections, polydipsia and polyuria, and serum laboratory tests showed normal calcium and phosphorus concentrations, high PTH and discreetly reduced magnesium, and an increase in urinary calcium. Nephrocalcinosis was seen on computed tomography of the kidney. In order to optimize the etiological diagnosis considering several candidate genes, we chose the use of the complete exome sequencing technique (WES), which identified 105,390 variants between mutations and polymorphisms, which did not justify the phenotype. The main diagnostic hypothesis would be a mutation in the CLDN16 gene, responsible for Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis (FHHNC), initially not identified by the WES. However, when the BAM (binary alignment) file was evaluated to verify the reading coverage, we observed the absence of exons 2 to 5 of the CLDN16 gene, and the hypothesis of large gene deletion was confirmed by the PCR and MLPA techniques. This paper will present a review of the literature on the subject, in addition to describing FHHNC in more detail. FHHNC is caused by the mutation of genes encoding the Claudine 16 or Claudine 19 proteins, which are para-cellular adhesion proteins located in the ascending portion of the Henle loop. These molecules undergo heterodimerization, forming a para-cellular barrier that regulates the absorption of calcium and magnesium. In addition to hypomagnesemia, hypercalciuria and nephrocalcinosis, which progresses to chronic renal failure,

it is usually associated with secondary hyperparathyroidism. Recently, the presence of Amelogenesis imperfecta associated with the syndrome, also observed in this patient, has been described. The WES technique has brought great advances in the diagnosis of point mutations, but still presents limitations in the detection of large deletions or duplications. This work provided a great learning and accumulation of knowledge on the interpretation of molecular biology methodologies in the diagnosis of endocrine diseases.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, considera-se doença rara quando apresenta uma incidência inferior ou igual a 1,3 casos para cada 2.000 indivíduos [1]. Estudos epidemiológicos apontam que cerca de 8% das pessoas são identificadas por apresentar um distúrbio genético antes de atingir a idade adulta [1]. Em 2002, cerca de 200.000 pessoas eram portadores de doenças raras nos Estados Unidos [2]. Existem aproximadamente 7.000 doenças raras conhecidas, sendo as doenças monogênicas ou de herança mendeliana responsáveis por cerca de 80% dos casos [3,4]. Fazer o diagnóstico destas doenças não é fácil, pois o conhecimento sobre elas é, muitas vezes, limitado. O paciente acaba sendo submetido a diversos procedimentos diagnósticos, com grande impacto psicológico, social e financeiro, e que muitas vezes se mostram inconclusivos, impedindo um tratamento potencial e levando à falta de orientação antecipatória e prognóstica [5].

Com a evolução tecnológica, o uso de sequenciamento de nova geração (SNG) tem possibilitado um incrível progresso no diagnóstico genético de vários distúrbios hereditários, incluindo as doenças raras. Porém, estas novas tecnologias proporcionaram grandes desafios relacionados à análise destes dados, como a sua interpretação e o gerenciamento de achados incidentais [6].

Neste contexto, o presente estudo pretende descrever o processo para o diagnóstico genético de uma doença rara, em um paciente portador de nefrocalcinose, hiperparatireoidismo e amelogenesis imperfecta.

Revisão da literatura

1.1 Nefrocalcinose

1.1.1 Aspectos gerais sobre Nefrocalcinose

A nefrocalcinose (NC) foi descrita pela primeira vez por Virchow em 1855 e é definida como um depósito generalizado de oxalato de cálcio ou fosfato de cálcio no parênquima renal (placa de Randall's) [7,8].

A nefrocalcinose pode ser classificada em 3 formas: a- molecular ou química, observada em pacientes com aumento do cálcio intracelular que não visualizados por via microscópica ou por exame de imagem; b- forma microscópica quando o depósito mineral é observado em tecido obtido por biópsia renal e visualizado através de um microscópio e c- forma macroscópica que pode ser visualizada em exames de imagem. Sua evolução acarreta dano renal progressivo, geralmente associado ao aumento dos níveis de cálcio, fósforo e oxalato na urina [9].

A nefrocalcinose pode ser medular (em 97% dos casos) ou cortical (em 3% dos casos), sendo esta última a sua forma mais grave, como ocorre na necrose cortical renal, na pielonefrite ou glomerulonefrite crônica, na doença policística autossômica recessiva e na nefrocalcinose cortical nodular benigna [7].

Em muitos casos, distúrbios metabólicos podem estar associados à nefrocalcinose e à nefrolitíase. Os principais fatores etiológicos da NC são o aumento das excreções urinária de cálcio, fosfato ou oxalato, que podem estar associados à hipercalcemia e hiperfosfatemia. A hipocitratúria pode também contribuir, uma vez que o citrato forma um complexo solúvel com o cálcio no filtrado glomerular, inibindo a formação dos cristais [7].

Na grande maioria dos casos a nefrocalcinose é assintomática e lentamente progressiva, sendo detectada de forma incidental durante exame de imagem do abdome ou tórax.

Eventualmente, alguns sintomas podem estar presentes, como poliúria e polidipsia. Como investigação etiológica é necessário a análise do perfil metabólico no sangue e urina.

A nefrocalcinose na população pediátrica é rara quando comparada com adultos e pode aparecer nos primeiros anos de vida, principalmente quando relacionada a tubulopatias hereditárias ou erro inato do metabolismo [10]. O primeiro relato de nefrocalcinose em crianças ocorreu em 1960, quando Daeschner et al. descreveram a presença de calcificação no parênquima renal em 3 crianças. Estes três casos tiveram como causa o excesso de vitamina D, a hipercalcúria idiopática e a acidose tubular renal [11]. Desde então, diversos autores têm publicado as principais etiologias de nefrocalcinose na infância. Um estudo na Alemanha que estudou 152 crianças e adolescentes com NC, encontrou as tubulopatias hereditárias e a hipercalcúria idiopática como principais fatores etiológicos. Retardo de crescimento estava presente em cerca de metade das crianças acometidas, enquanto função renal prejudicada foi raro e nenhuma criança desenvolveu insuficiência renal terminal [12].

Em 2007, outro estudo em 40 crianças indianas com nefrocalcinose revelou como principais etiologias: acidose tubular renal distal em 50% dos pacientes, hipercalcúria idiopática em 7.5% e hiperoxalúria em 7.5%. A maioria dos pacientes apresentava retardo de crescimento e 35% dos pacientes evoluíram com redução da taxa de filtração glomerular [13].

Ammenti et al publicaram um estudo multicêntrico nos EUA em que avaliaram 41 crianças com diagnóstico de NC bilateral pela ultrassonografia. Entre as etiologias mais frequentes estavam as tubulopatias hereditárias e a intoxicação por vitamina D. Nestas crianças, a função glomerular estava normal em 83%, 4 (9,7%) crianças apresentaram redução da taxa de filtração glomerular e 3 (7,3%) crianças já manifestavam uma insuficiência renal terminal [14]. Neste trabalho, apenas as doenças de causas hereditárias são abordadas.

1.1.2 Nefrocalcinose de causas hereditárias

1.1.2.1 Síndrome de Bartter:

A síndrome de Bartter descrita pela primeira vez em 1962, sendo caracterizada por alcalose metabólica associada à hipocalemia, hipocloremia, hiperreninemia, com pressão arterial normal [15]. Existem 5 variantes genéticas desta síndrome, sendo causada por mutações que estão direta ou indiretamente relacionadas com a perda de função de proteínas responsáveis pela reabsorção do cloro na porção ascendente espessa da alça de Henle [16]. A nefrocalcinose tem sido descrita nos tipos I, II e V.

A Síndrome de Bartter tipo 1 (Sd de Bartter antenatal ou Sd de hiperprostaglandina E2) é causada por uma mutação no co-transportador de sódio-potássio-cloro (NKCC2) da membrana celular apical, codificado pelo gene *SCL12A1*, localizado no cromossomo 15q15-21, sendo uma doença de herança autossômica recessiva, caracterizada pela redução na reabsorção de sódio, potássio e cloro, causando alcalose metabólica associada à hipocalemia, hipercalcúria, hiperaldosteronismo e nefrocalcinose. A Síndrome de Bartter tipo II é causada por uma mutação no canal de potássio intraluminal (ROMK1), codificada pelo gene *KNJ11*, localizado no cromossomo 11q24, ocasionando a redução na reabsorção do sódio, cloro e potássio, acarretando hipocalemia, alcalose, hipercalcúria e em alguns casos nefrocalcinose. A Síndrome de Bartter tipo V ou hipoparatiroidismo autossômico dominante, é causada por uma mutação ativadora do receptor sensor de cálcio (CaSR), localizado no cromossomo 3q13.3-q21, acarretando inibição da reabsorção de cálcio, ocasionando hipercalcúria, hipocalcemia, hiperfosfatemia, hipofosfatúria, e, eventualmente, hipocalemia e nefrocalcinose [13].

1.1.2.2 Acidose tubular renal (ATR):

A acidose tubular renal pode ser definida pela presença de acidose metabólica proveniente de um defeito da reabsorção tubular renal de HCO_3^- e/ou excreção urinária de H^+ . Classifica-se a acidose tubular renal em 4 tipos: ATR tipo 1 ou distal, ATR tipo 2 ou proximal, ATR tipo 3, com características híbridas dos tipos 1 e 2, e a ATR tipo 4 ou hipercalêmica [17]. A nefrocalcinose costuma estar presente nos casos de ATR distal, que podem ser subdivididas conforme a herança. A ATR distal autossômica recessiva ocorre por uma mutação no gene *ATP6V1B1*, localizado no cromossomo 7q33-q34, que codifica a subunidade β da bomba de H^+ (H^+ATPase), localizada na membrana apical das células intercaladas tipo α do ducto coletor. Portadores desta doença apresentam acidose hiperclorêmica, hipocalemia, nefrocalcinose e nefrolitíase. ATR distal autossômica dominante ocorre por mutação no gene *SCL4A1*, localizado no cromossomo 17q21-q22, que codifica o trocador iônico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE-1) da membrana basolateral das células intercaladas tipo α ocasionando hipocalemia, acidose hiperclorêmica, nefrocalcinose e nefrolitíase [18,19].

1.1.2.3 Raquitismo hipofosfatêmico:

O raquitismo hipofosfatêmico hereditário é um grupo de doenças caracterizadas por perda de fosfato urinário, com a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sérica inapropriada, raquitismo, retardo de crescimento, osteomalácia, sendo que a nefrocalcinose está presente em 80% dos casos. A sua forma mais frequente é o raquitismo hipofosfatêmico ligado ao cromossoma X (XLH). Ocorre devido mutação no gene *PHEX* (Phosphate regulating gene with homologues to Endopeptidases on the X-chromosome), localizado no cromossomo Xp22.1-22.2, que provoca redução da degradação ou aumento da síntese do fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23), levando ao aumento da fosfatúria. Além disso, o aumento do FGF-23 atua na inibição da enzima

1 α -hidroxilase, responsável pela conversão do calcidiol em sua forma ativa, o calcitriol. O raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominante (ADHR), apresenta mutação no próprio gene do FGF23, prolongando a sua atividade sobre o efeito fosfatúrico. O raquitismo hipofosfatêmico autossômico recessivo (ARHR), ocorre devido a uma mutação inativadora do gene *DMP1* (Proteína de matriz da dentina 1). Esta proteína, expressa nos osteoblastos e osteócitos, regula negativamente a transcrição do *FGF23* [20,21]. A mutação inativadora do gene *SLC34A3*, que codifica o cotransportador de sódio fósforo dependente (NPT2c), é responsável pelo raquitismo hipofosfatêmico com hipercalcúria caracterizado por hiperfosfatúria, baixa estatura, arqueamento de membros inferiores, hipercalcúria, elevação dos níveis de calcitriol, nefrolitíase e nefrocalcinose [22,23].

1.1.2.4 Hipomagnesemia familiar com hipercalcúria e nefrocalcinose (FHNC):

Doença tubular renal de herança autossômica recessiva, caracterizada pela perda urinária de magnésio e cálcio, nefrocalcinose bilateral e insuficiência renal crônica progressiva [24,25]. É causada por uma mutação nos genes *CLDN16* ou *CLDN19*, que codificam as proteínas claudina 16 e claudina 19, respectivamente. Pacientes com mutação na *CLDN19* apresentam também alterações oculares, como nistagmo, miopia ou coloboma macular [26]. As proteínas claudina 16 e claudina 19 são expressas na porção ascendente espessa da alça de Henle e interagem entre elas, regulando a reabsorção paracelular de cálcio e magnésio [27]. Maiores detalhes sobre esta síndrome serão apresentados a frente.

1.1.2.5 Doença de Dent:

Tubulopatia proximal, ligada ao X, proveniente de mutação inativadora do gene *CLCN5*, localizado no cromossomo Xp11.22, que codifica o canal de cloro (CIC-5), gerando alterações como hipercalcúria, proteinúria de baixo peso molecular, aminoacidúria, glicosúria e fosfatúria.

Pode estar associado à síndrome de Fanconi. Alguns pacientes desenvolvem nefrolitíase, nefrocalcinose, insuficiência renal progressiva e raquitismo hipofosfatêmico [28,29].

1.1.2.6 Síndrome de Lowe:

Também conhecida como síndrome de Dent 2, a Síndrome oculocerebrorenal de Lowe é composta pela tríade diagnóstica que inclui anomalias oculares, como hidroftalmia, déficits neurológicos como retardo mental e disfunção tubular renal semelhante à síndrome de Fanconi, podendo apresentar nefrolitíase e nefrocalcinose, evoluindo para insuficiência renal progressiva. É causada pela mutação no gene *OCRL1*, no cromossomo Xq26.1 que codifica a proteína fosfatidilinositol polifosfato 5-fosfatase, localizada no complexo de Golgi [28,30].

1.1.2.7 Hiperoxalúria primária:

As hiperoxalúrias primárias têm sido associadas à nefrocalcinose, nefrolitíase e insuficiência renal progressiva. As hiperoxalúrias primárias são doenças de herança autossômica recessiva causada por um defeito no ciclo do glioxilato que resulta em aumento da produção endógena de oxalato, com deposição de oxalato de cálcio nos rins e em outros órgãos [31]. São descritos 3 tipos de hiperoxalúria que envolvem enzimas diferentes dentro da via metabólica do glioxilato. Hiperoxalúria primária do tipo 1 ocorre por mutação do gene *AGTX*, localizado no cromossomo 2q36-37, que codifica a enzima glioxilato aminotransferase (AGT), provocando nefrocalcinose. Evolui para insuficiência renal terminal em 50% dos pacientes na idade adulta, além de manifestações extra renais, como defeito de condução cardíaca, dor óssea, aumento do risco de fraturas e redução da acuidade visual. Na hiperoxalúria primária do tipo 2 a mutação do gene *GRHPR*, localizado no cromossomo 9p11, provoca redução ou ausência na atividade da enzima glioxilato redutase/hidroxipiruvato redutase, levando à nefrolitíase recorrente, porém nefrocalcinose e insuficiência renal são raras. A hiperoxalúria primária do tipo 3 é causada, por

uma mutação do gene *HOGAI*, que codifica a enzima 4-OH-2-oxoglutarato aldolase, gerando urolitíase na infância [32,33].

1.1.2.8 Síndrome de William-Beuren:

É causada por microdeleção do gene da elastina (*ELN*) localizado no cromossomo 7. Caracteriza-se por fâcies típica (elfo), hipertensão, estenose aórtica supraválvula, cognição prejudicada, anomalias endócrinas, genitourinárias, dentais, oftalmológicas e dermatológicas. Hipercalcemia, hipercalcúria e nefrocalcinose podem estar presentes em 5 a 10% dos pacientes [34].

1.2 Hiperparatireoidismo na infância

As paratireóides se apresentam sob a forma de quatro nódulos originários do terceiro e quarto arcos branquiais e localizam-se na topografia da tireoide. Cada glândula tem crescimento progressivo até a terceira década de vida [35]. Em sua microscopia, apresenta células principais produtoras de paratormônio (PTH), uma proteína constituída por cadeia simples de polipeptídeos com 84 aminoácidos, que tem como função primordial a manutenção da concentração de cálcio iônico, fundamental para diversos processos intra e extracelulares. Em 1993, foi identificado pela primeira vez o gene do receptor/sensor de cálcio (*CASR*), expresso em todos os tecidos relacionados com o controle da homeostase do cálcio (paratireóide, células C tireoideanas, intestino, osso e rins). Este receptor/sensor é responsável pelo reconhecimento de pequenas mudanças da concentração do cálcio iônico, possibilitando, assim, o ajuste de sua concentração através da secreção de PTH e da reabsorção de cálcio pelos túbulos renais [36,37].

O hiperparatireoidismo primário (HPP) é caracterizado pela secreção elevada de PTH por um defeito de uma ou mais paratireóides, causando elevação da calcemia. No

hiperparatireoidismo secundário, a elevação do PTH é uma resposta adaptativa à homeostase do cálcio e da Vitamina D.

1.2.1 Hiperparatireoidismo primário:

O HPP é bastante raro na infância, com uma incidência estimada de apenas 3 a 5 casos para cada 100.000 nascidos vivos por ano, sem predileção de sexo [38,39]. Geralmente, nos pacientes jovens, o HPP é sintomático, com hipercalcemia, nefrolitíase e comprometimento ósseo.

Entre os fatores etiológicos do HPP na população pediátrica, as síndromes genéticas associadas a mutações de linha germinativa de genes como *MEN1*, *CASR* e *HRPT2/CDC73*, representam as principais causas e diferem sua incidência conforme a faixa etária ao diagnóstico [40].

1.2.1.1 Mutação inativadora do CASR

Mutações com perda de função do *CASR* estão associadas à hipercalcemia hipocalciúrica familiar e ao hiperparatireoidismo neonatal grave. Estas condições costumam estar presentes desde o nascimento, devendo entrar no diagnóstico diferencial de hiperparatireoidismo na infância.

A hipercalcemia hipocalciúrica familiar (FHH) é uma alteração de origem autossômica dominante, provocada por uma mutação em heterozigose do *CASR*, caracterizada por hipercalcemia moderada associada à excreção urinária de cálcio reduzida e concentrações de PTH discretamente elevadas ou inapropriadamente normais [41]. Geralmente são assintomáticos ou apresentam sintomas inespecíficos, como dores articulares, fadiga e cefaléia. Trata-se de uma condição benigna, não sendo indicado tratamento cirúrgico na maior parte dos casos. O principal

recurso diagnóstico diferencial com o hiperparatireoidismo primário é a baixa fração de excreção do cálcio renal, geralmente inferior a 1% [42].

Quando a mesma mutação no *CASR* ocorre em homozigose, entretanto, o quadro é bem mais grave, sendo chamado de hiperparatireoidismo neonatal grave (HPTNG), com concentrações plasmáticas de cálcio e PTH bastante elevadas. O quadro clínico geralmente está associado à hiperplasia das glândulas paratireoides, com sintomas decorrentes de hipercalcemia e importante comprometimento da mineralização óssea [43].

1.2.1.2 Neoplasia Endócrina Múltipla

A neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (MEN1) é a principal causa de hiperparatireoidismo primário hereditário, sendo originada na grande maioria das vezes por uma mutação germinativa do gene *MEN1*, que codifica a proteína supressora de tumor Menin. O HPP costuma estar presente em mais de 90% dos casos, sendo raro na primeira década de vida, manifestando-se clinicamente com hipercalcemia. Geralmente é acompanhado com doença multiglandular, apresentando como definição diagnóstica a presença de hiperfunção em dois dos três tecidos: hipófise anterior, paratireóide e tecido endócrino gastro-entero-pancreático [44].

A neoplasia endócrina múltipla do tipo 2A (MEN2A), ocasionada pela mutação no proto-oncogene RET, localizado no cromossomo 10, é caracterizada pela presença de carcinoma medular de tireóide, feocromocitoma e hiperparatireoidismo. HPP ocorre em 20 a 30% dos casos, com quadro clínico mais brando quando comparado à HPP do MEN1. O hiperparatireoidismo é geralmente diagnosticado na terceira década de vida e embora possa ocorrer em crianças, é um achado muito raro [45]. Magalhães PKR et al, descreveram um caso

de HPP como primeira manifestação clínica de MEN2A em uma criança de 5 anos portadora da mutação p.C634R RET em Ribeirão Preto [46].

1.2.1.3 Síndrome hiperparatireoidismo associado a tumor de mandíbula - HPT-JT

A HPT-JT, é uma doença rara de origem autossômica dominante, causada pela mutação germinativa do gene *HRPT2/CDC73*. É caracterizada por HPP causado por adenoma ou carcinoma de paratireóide associado a lesões fibro-ósseas na maxila ou mandíbula. Geralmente a síndrome se desenvolve no final da adolescência ou no início da idade adulta [47].

1.1.2 Hiperparatireoidismo secundário

O hiperparatireoidismo secundário é caracterizado pela hiperplasia das glândulas paratireóides e elevação do nível sérico PTH em resposta a um estímulo fisiológico, como a redução da calcemia. Entre os fatores implicados na patogênese destaca-se a hipocalcemia, hiperfosfatemia, déficit de vitamina D, anormalidades no receptor sensor de cálcio (CASR) e no receptor de vitamina D (VDR) das paratireóides, resistência óssea à ação do PTH e as fosfatoninas [48]. A hipocalcemia geralmente está associada a ingestão reduzida de cálcio, a sua má-absorção intestinal ou a um aumento da sua excreção renal. A deficiência de vitamina D assim como a redução na produção de sua forma ativa [1,25(OH)₂ vitamina D ou calcitriol] pelos túbulos renais diminui a absorção intestinal do cálcio, reduz a mobilização óssea de cálcio, menor expressão do VDR e possui efeito direto sobre as paratireóides, suprimindo a transcrição do gene do PTH [49]. A elevação da fosfatemia e do calcitriol estimulam a produção do fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF-23), que é um hormônio produzido nos osteócitos e osteoblastos. O FGF-23 se liga e ativa o receptor de fator de crescimento 1 (FGFR1) que deve estar acoplado a uma proteína transmembrana Klotho, formando um complexo receptor de

Klotho-FGF. O FGF-23 apresenta ação fosfatúrica, reduzindo a reabsorção de fósforo no túbulo proximal estimulando o aumento de síntese e secreção de PTH [50].

1.3 *Amelogenesis Imperfecta* (AI)

A amelogenesis ocorre através da síntese e secreção de proteínas pelo ameloblasto, célula responsável pela formação do esmalte dentário, que é um tecido formado por células epiteliais originadas do ectoderma, altamente mineralizado, com mais de 95% de seu volume ocupado por cristais de hidroxiapatita [51]. Este difere de outros tecidos mineralizados, como o osso, à medida que não é colágeno e não sofre remodelação [52]. O esmalte dentário apresenta superfície lisa e aparência translúcida e pode ser alterado de modo qualitativo, afetando a forma ou espessura do esmalte, ou quantitativo quando afeta seu conteúdo mineral, gerando opacidade restrita, opacidade difusa e/ou descoloração. Defeitos no desenvolvimento do esmalte podem ocorrer por fatores sistêmicos, traumáticos, ambientais ou genéticos [53]. Entre os fatores não genéticos estão ingestão de flúor em excesso [54], traumatismo no germe dentário, uso de antibióticos como a tetraciclina [55], hipocalcemia grave prolongada na infância [56] ou na insuficiência renal crônica [57]. Quando o defeito tem origem genética recebe o nome de *Amelogenesis Imperfecta* [51].

AI é uma doença, que provoca uma alteração variável no desenvolvimento, quantidade e/ou qualidade do esmalte dentário dos dentes decíduos e permanentes. Em suas formas mais leves pode ocorrer apenas uma alteração da coloração. Nas mais graves, os dentes são propensos à desintegração pré e/ou pós eruptiva [58]. Pode se apresentar como de herança autossômica dominante, recessiva ou ligada ao X. Seu fenótipo é bastante variado e depende do gene envolvido. Cerca de 5 a 10% de todos os casos de AI, apresentam herança ligada ao X, sendo ocasionado principalmente por mutação no gene *AMELX* [59]. Entre os casos de herança

autossômica dominante, mutações nos genes *ENAM* e *FAM83H* são as mais frequentes [60]. A maioria dos casos de AI apresentam herança autossômica recessiva com mutações principalmente nos genes *KLK4* e *MMP20* [61]. Outros genes como *AMBN*, *WDR72* e *DLX3* também têm sido relacionados com a gênese da AI [62].

Em 1972, MacGibbon descreveu pela primeira vez o caso de dois irmãos com ausência de esmalte dentário associado à nefrocalcinose, posteriormente denominada de “*enamel-renal-syndrome*” (ERS) [63]. Mais de uma década depois, Lubinsky et al publicaram os casos de dois irmãos que apresentavam enurese noturna, poliúria e infecção urinária de repetição. Em investigação foi detectado calcinose medular renal em ambos irmãos. Ao exame físico, os dentes permanentes eram escurecidos e completamente sem esmalte. Ambos apresentaram desenvolvimento neuropsicomotor adequado sem outros sinais ou sintomas [64]. Em 2006 foi publicado dois casos de irmãs com hipomagnesemia familiar, hipercalciúria e nefrocalcinose, em que apresentavam alterações de dentição, incluindo hipoplasia do esmalte dentário [65]. Em 2014 Ashkenazi et al descreveram associação de ERS com perda óssea periodontal [66]. Mutação no gene *FAM20A*, de herança autossômica recessiva, localizado no cromossomo 17q24, foi descrita inicialmente relacionada com alterações dentárias como amelogenesis imperfecta, hiperplasia gengival e erupção dentária prejudicada [67]^[68]. Em 2012, Jaureguiberry et al, identificaram 20 diferentes mutações do gene *FAM20A* relacionado à ERS através do uso de sequenciamento de nova geração [69]. Novos casos de ERS também foram relacionados a mutação do gene *FAM20A* [70,71]. Bardet et al. recentemente relataram anormalidades do esmalte em pacientes com FHHNC com mutações no gene *CLDN16*, estabelecendo o papel do *CLDN16* em ameloblastos, que quando deficiente pode levar à formação anormal de esmalte [72,73]. Além disso, Yamaguti et al. relataram a associação de FHHNC com amelogenese imperfeita em um paciente com uma mutação *CLDN19* [74].

1.4 O uso do sequenciamento completo do exoma para o diagnóstico genético

Antes da biologia molecular, para realizar o diagnóstico de doenças mendelianas raras, era necessário a utilização de métodos tradicionais rotineiramente empregados pelo médico como o reconhecimento de características fenotípicas, de exames de análises clínicas e imagens. São processos caros e demorados, com uma taxa de sucesso relatada de apenas 46%[75]. O avanço da bioinformática e da biologia molecular mudou o cenário diagnóstico para estas doenças.

Os éxons são as regiões codificadoras de proteínas, constituem apenas 1% do genoma humano e abrigam cerca de 85% das mutações relacionadas aos distúrbios monogênicos[76]. As plataformas utilizadas para o sequenciamento completo do exoma conseguem gerar sequência de centenas de megabases em uma única corrida permitindo ampla cobertura de vastas regiões o que torna o método eficiente na identificação de variantes genéticas [77][78]. É importante estar ciente que o sequenciamento do exoma tem como alvo aproximadamente 97% dos éxons, entretanto cerca de 10% deles podem não ter cobertura suficiente para as variantes heterozigotas. Compreender as limitações e potenciais armadilhas desta tecnologia são essenciais para a sua utilização[79].

Entre as principais limitações e armadilhas estão as restrições técnicas, uma vez que, o sequenciamento completo do exoma não pode identificar grandes inserções ou deleções, repetição de trinucleotídeos, modificações epigenéticas como padrão de metilação ou mutação de região intrônica. Além disso, não dá cobertura para sequências específicas, como a do DNA mitocondrial[80]. Restrições teóricas também estão presentes e ocorrem principalmente devido à grande carga analítica de variantes de significância incerta (VUS) e a identificação de achados secundários não relacionados a doença[81]

OBJETIVO

OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi

- identificar o diagnóstico etiológico em uma criança com nefrocalcinose, hiperparatireoidismo e *amelogenesis imperfecta* utilizando a técnica de WES, além de estabelecer relações entre os achados moleculares e suas características clínicas.
- descrever e discutir os cuidados na análise e interpretação do exoma e reconhecer as suas limitações durante investigação diagnóstica em uma criança com nefrocalcinose, hiperparatireoidismo e *amelogenesis imperfecta* e aborda como prosseguir na investigação.

CASO CLÍNICO

CASO CLÍNICO

PHC, sexo masculino, 7 anos de idade, filho de pais não consanguíneos, encaminhado ao ambulatório de fragilidades ósseas pela equipe de cirurgia de cabeça e pescoço para investigação de hiperparatireoidismo secundário. O mesmo havia sido encaminhado ao ambulatório de cirurgia de cabeça e pescoço para tratamento cirúrgico hiperparatireoidismo primário.

Menor nasceu com 38 semanas de idade gestacional, parto cesariana sem intercorrências. Peso de nascimento de 2740 g (P10-50) e comprimento de 47cm (P10-50). Durante o primeiro ano de vida apresentou refluxo gastroesofágico, internação por meningite viral e três episódios de infecção do trato urinário.

Entre os sinais e sintomas apresentava episódios de vômitos, poliúria e polidipsia com desenvolvimento neuropsicomotor adequado. Exame físico revelou a presença de manchas esbranquiçadas no esmalte dentário, sem outros achados relevantes.



Iniciado investigação etiológica das infecções do trato urinário de repetição, sendo evidenciado a presença de nefrocalcinose na ultrassonografia do trato urinário.



Em avaliação laboratorial encontrado a presença de hipercalcúria, hipomagnesemia, hiperparatiroidismo, deficiência de vitamina D e alcalose metabólica intermitente. Apresentava função renal adequada.

Exames de análises clínicas:

Material: Sangue

Exame	2011	2012	2013	2014	Referência
Cálcio total	9,5	9,9	9,9	9,8	8,8 a 10,8mg/dL
Cálcio iônico	1,2	1,27	1,14	1,3	1,11 a 1,40 mmol/L
Fósforo	4,8	4,9	4,4	4,6	4,5 a 5,5 ng/dL
Fosfatase Alcalina	229	218	248	256	142 a 335U/L
PTH	216	104,3	115	90,1	10 a 65 pg/mL

Sódio	137	142	139	139	136 a 145 mEq/L
Potássio	3,9	3,8	4,3	4,2	3,5 a 4,5 mEq/L
Magnésio	1,4	1,3	1,5	1,6	1,7 a 2,1 mg/L
Cloro	101	99	107	99	98 a 107 mEq/L
pH/HCO ₃	7,34/ 26,2	7,34/24		7,32/12,1	7,33 a 7,43/23 a 27mmol/L
TSH	4	3,1	5	3,1	0,60 a 5,4mUI/L
25(OH)D	14,4	32,9	36,4	22,3	>30ng/mL
Creatinina	0,66	0,65	0,87	0,76	0,5 a 1,0mg/dL

Material: Urina de 24horas

		Valor de referência
Volume	2360ml	
Cálcio	6,6mg/Kg/24hs	Até 12 anos: <4mg/Kg/24hs
Sódio	2,2mg/Kg/24hs	2,5 a 5,1 mg/Kg/24hs
Magnésio	5,3mg/Kg/24hs	07 a 3,9mg/Kg/24hs
Fósforo	12mg/Kg/24hs	7,8 a 17mg/Kg/24hs

Cloro	3,1mg/Kg/24hs	2,5 a 5,3 mg/Kg/hs
-------	---------------	--------------------

Realizado cintilografia de paratireoide que excluiu causa primária para o hiperparatireoidismo sendo considerado secundário à hipercalcúria.

Densitometria óssea de coluna lombar e corpo inteiro normal (Anexo 1)

Avaliação de acuidade visual e fundoscopia descartou qualquer comprometimento.

Iniciado tratamento com reposição de magnésio, colecalciferol, e diurético tiazídico com o objetivo de reduzir a calciúria.

Durante a investigação, exames foram realizados nos pais e irmã, todos sem anormalidades

ARTIGO

Artigo submetido para Clinical Cases in mineral and bone metabolism

**A large *CLDN16* exon deletion causing nephrocalcinosis and amelogenesis:
broadening the genetic heterogeneity in enamel-renal syndrome**

¹Vanessa Radonsky, MD; ¹Marina M. L. Kizys, PhD; ¹Renata Pires Dotto; ²Priscila Ligeiro Gonçalves Esper, MD; ²Ita Pfeferman Heilberg, MD, PhD; ¹Magnus R. Dias-da-Silva, MD, PhD; and ¹Marise Lazaretti-Castro MD, PhD.

Affiliations:

Department of Medicine, Division of Endocrinology¹ and Nephrology², Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil.

Address correspondence to: Vanessa Radonsky, Universidade Federal de São Paulo, Rua Bergamota, 388, 05468-000, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: vanessaradonsky@yahoo.com

Keywords: hypomagnesemia, WES, FHHNC, exome, hypercalciuria

Short title: CLDN16 deletion causing nephrocalcinosis with amelogenesis.

Funding Source: The study was conducted without external funding.

Financial disclosure: The authors have no financial disclosures.

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Abbreviations:

mTAL: medullary thick ascending limb

WES: whole-exome sequencing
DXA: dual-energy x-ray absorptiometry
25OHD: 25-hydroxyvitamin D
PTH: parathyroid hormone
FHHNC: familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis
BAM: binary sequence alignment/map
PCR: polymerase chain reaction
MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification
NGS: next-generation sequencing
GFR: glomerular filtration rate
NR: normal range
RBP: retinol-binding protein
ERS: enamel-renal syndrome
MAF: minor allele frequencies

Table of Contents Summary

Case report of a boy with nephrocalcinosis and amelogenesis imperfecta with a large *CLDN16* deletion not detected by whole-exome sequencing analysis.

CONTRIBUTOR'S STATEMENT PAGE

Dr. Radonsky, Dr. Dias-da-Silva, Dr. Heilberg, and Dr. Lazaretti-Castro made substantial contributions to the conception and design of the study, as well as to the analysis and interpretation of the data. Ms. Kizys contributed to the whole-exome sequencing analysis. Ms. Dotto performed multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assays. Dr. Esper critically revised the results.

All authors approved the final version of the manuscript, as submitted, and agreed to be

accountable for all aspects of the work.

Abstract

We describe here the first case of amelogenesis imperfecta in a boy with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC) bearing a large deletion of the *CLDN16* gene. The proband was a 6-year-old boy, the second child of nonconsanguineous parents, who presented with a history of recurrent urinary tract infection, polyuria, and polydipsia. On physical examination, the patient presented dental enamel abnormalities suggestive of amelogenesis imperfecta. Blood tests revealed decreased 25-hydroxyvitamin D levels, increased parathyroid hormone levels, and magnesium levels slightly below normal. Urinary calcium excretion was elevated. On helical computed tomography, the patient exhibited a severe form of nephrocalcinosis, suggesting the occurrence of FHHNC. However, a whole-exome sequencing analysis revealed no mutation of candidate genes, *CLDN16* and *CLDN19*. We also ruled out a mutation in the *FAM20A* gene, which is responsible for the enamel-renal syndrome, conferring an association of amelogenesis imperfecta with nephrocalcinosis. A second look at the binary sequence alignment/map file of *CLDN16* revealed an absence of exons 2 to 5, suggesting that the exome analysis probably missed a large *CLDN16* deletion, which was confirmed by polymerase chain reaction and multiplex ligation-dependent probe amplification assay. *CLDN16* and *CLDN19* encode tight junction proteins in the renal

thick ascending limb and interact synergistically to form a cation-selective channel, which is vital for paracellular absorption of magnesium and calcium. *CLDN16* deficiency is known to lead to abnormal secretory ameloblast tight junction protein as a cause of dental disorder leading to abnormal enamel formation.

Introduction

Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC) is a rare autosomal recessive tubular disease caused by a defect in renal magnesium reabsorption in the medullary thick ascending limb of the loop of Henle (mTAL) [1,2]. In 1999, Simon identified the *CLDN16* gene (formerly *PCLN1*) which harbored the first known pathogenic mutation of FHHNC [3]. Patients with FHHNC may have, alternatively, a mutation in the *CLDN19* gene with a similar renal phenotype to that of patients with FHHNC bearing the *CLDN16* mutation, but with occasional severe ocular abnormalities. The *CLDN16* and *CLDN19* genes encode the tight junction-associated transmembrane proteins claudin 16 and claudin 19, respectively, which regulate the paracellular diffusion of magnesium and calcium along the mTAL [4–6].

The clinical presentation of FHHNC includes hypomagnesemia, severe hypercalciuria, and bilateral nephrocalcinosis leading to progressive renal failure. Patients usually present with polyuria, polydipsia, nephrolithiasis, recurrent urinary tract infection, failure to thrive, and/or

abdominal pain [2,7–9]. Increased parathyroid hormone (PTH) levels, regardless of glomerular filtration rate (GFR), have been described in several cases [10–12]. Amelogenesis imperfecta is a group of inherited defects of dental enamel formation featuring clinical and genetic heterogeneity [13].

In this report, we describe a large *CLDN16* deletion associated with amelogenesis imperfecta.

Case Report

Patient's history and diagnostic investigation

The proband was a 6-year-old boy who was the second child of nonconsanguineous parents, born at term after an uneventful pregnancy, weighing 2740 g (10th – 50th percentile) and with a length of 47 cm (10th – 50th percentile). At UNIFESP, the patient was referred from the Head and Neck Surgery Outpatient Clinic to the Bone Metabolism Outpatient Clinic for investigation of secondary hyperparathyroidism.

The parents reported that the patient presented episodic vomiting, polyuria, and polydipsia, as well as recurrent urinary tract infection, which was suggested by the observation of leukocyturia. The proband had nonsyndromic short stature and presented normal physical and motor development. Upon admission, his physical examination was otherwise normal except for his permanent teeth, which were discolored, pitted, and grooved, raising the suspicion of

amelogenesis imperfecta (Figure 1A). Unenhanced helical computed tomography confirmed the occurrence of a severe form of nephrocalcinosis (Figure 1B).

The patient's estimated GFR (eGFR) calculated with the Schwartz formula [14] was 99.5 mL/min/1.73 m² (normal range [NR] > 80 mL/min/1.73 m²). Blood tests revealed no signs of metabolic acidosis or alkalosis; normal calcium, phosphate, and potassium levels; decreased 25-hydroxyvitamin D (25OHD) levels; increased PTH levels; and magnesium levels slightly below normal (Table 1). Sestamibi scanning of the parathyroids showed a tenuous and persistent concentration of the radiopharmaceutical in the projection of the inferior left lobe of the thyroid, which could correspond to parathyroid hyperplasia. The patient presented severe hypercalciuria on 24-hour urine, but no other electrolyte abnormality. Retinol-binding protein (RBP) was normal at 0.09 mg/L (NR < 0.40 mg/L). PTH level remained increased despite normalization of 25OHD levels. Dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) of the lumbar spine and total body less head was within the NR for age and sex, despite the increased PTH level. The patient had no other relatives with hyperparathyroidism, nephrolithiasis, nephrocalcinosis, or amelogenesis imperfecta.

Total DNA was isolated from peripheral blood sample and submitted to whole-exome sequencing (WES) performed by EdgeBio (Gaithersburg, MD, USA) using the platform Illumina HiSeq 2000 (Illumina®, Inc., San Diego, CA, USA). The DNA library was constructed using Illumina TruSeq DNA Sample Preparation Kit (Illumina®, Inc., San Diego, CA, USA) and the

exons were captured with SeqCap EZ Human Exome Kit v3.0 (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA).

Result and Discussion

Several inherited disorders present with nephrocalcinosis and hypercalciuria in male patients with unaffected parents, which suggests the occurrence of X-linked or autosomal recessive patterns. This has prompted us to search initially for the targeted candidate genes shown in Table 2. Due to the absence of mental retardation, deafness, acidosis/alkalosis, increased tubular proteinuria, and abnormal serum electrolytes (calcium, phosphorus, or potassium) and urinary oxalate excretion, we ruled out distal renal tubular acidosis, primary hyperparathyroidism, hyperoxaluria, and Dent or Lowe disease.

The occurrence of mild hypomagnesemia, hypercalciuria, and increased serum PTH level raised the hypothesis of FHHNC, a condition caused by mutations in the *CLDN16* or *CLDN19* gene [15]. These genes encode tight junction proteins in the renal mTAL [16]. They interact synergistically to form a cation-selective channel, which is vital to generate a lumen-positive transepithelial potential that drives the paracellular absorption of magnesium and calcium [17–21]. However, *CLDN19* mutations would be unlikely in our patient due to the absence of ocular involvement [22]. Secondary hyperparathyroidism is usually present in *CLDN16* and *CLDN19* gene mutations, independent of renal function, and is associated with hypercalciuria.

Patients with idiopathic hypercalciuria due to decreased renal tubular calcium reabsorption or hypercalciuria due to renal calcium leak also show increased serum PTH levels [23–25].

The analysis of the proband's exome showed 105,390 variations, of which 1,020 were homozygous and 29 had minor allele frequencies (MAF) that were either unknown or <0.01% (data not shown). We observed variations in the *SLC12A1* (p. Val958Ala; rs1552311; MAF 0.9) and *CLCNKB* (p. Ala287Val; rs7367494; MAF 0.3) genes, which are associated with Bartter's syndrome [26,27], but the absence of alkalosis and hypokalemia in our patient was intriguing and unlikely to be truly causative of this syndrome.

Given that large gene deletions responsible for genetic disorders [28] may not be detected through WES analysis [29], the result of the analysis must always be regarded taking the patient's clinical presentation into consideration and reviewed using BAM analysis. We recommend caution in the interpretation of next-generation sequencing (NGS) applied for etiological diagnosis.

A similar report of a patient with late-onset nephrocalcinosis, hypomagnesemia, elevated PTH, and moderate chronic kidney disease associated with a large *CLDN16* deletion has been described [30]. The *CLDN16* gene comprises five exons and is cytogenetically located at 3q28. A second WES analysis of the present case, looking more closely at the BAM file, subsequently showed that exons 2 to 5 piling-up was absent in our patient (GRCh38/3:190,387,871-190,412,142). We further analyzed whether the *CLDN16* exons were

appropriately mapped by studying the paralogous *CLDN1* gene immediately downstream from *CLDN16*.

Therefore, the variant calling performed by EdgeBio missed an exonic homozygous deletion in *CLDN16*, perhaps by interpreting it as an absence of capture or variations, thus yielding a false negative result. To confirm this hypothesis, we evaluated all *CLDN16* exons by performing electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) products on samples from the proband and his parents, and comparing them with a normal control DNA. The proband's exon PCR electrophoresis only evidenced the amplification of exon 1 (Figure 2A), confirming a homozygous *CLDN16* deletion of exons 2 to 5, which was further corroborated by capillary electrophoresis using MLPA against exons 3 and 5 (Figure 2B). Our patient presented a similar *CLDN16* alteration reported by Yamaguti et al. [30] in a Brazilian patient, although the probands in both reports were not related [30].

Considering that amelogenesis imperfecta is a hereditary defect in the formation of dental enamel, we decided to verify the genes commonly associated with this defect in the proband's WES file. This analysis included the genes *ITGB6*, *AMBN*, *ENAM*, *C4orf26*, *MMP20*, *GPR 68*, *SLC24A4*, *WDR72*, *ACPT*, *KLK4*, and *AIIE2*, which are involved in recessive autosomal or X-linked traits [31].

On targeting the genes of amelogenesis imperfecta in the WES analysis, we found the homozygous variant p.His197Leu in *KLK4*, but its effect on protein is predicted to be benign by

PolyPhen and PROVEAN. Moreover, the frequency of the altered base is 0.3 to 0.9 by EVS and 1000 Genomes, respectively. *KLK4* mutations affect the maturation of enamel development by inhibiting the growth of crystallites and then affecting mineral deposition causing amelogenesis imperfecta [32,33].

Reports of nephrocalcinosis and amelogenesis imperfecta have been described since 1972 under the name of enamel-renal syndrome (ERS) (OMIM 204690) [34–39]. Various recessive *FAM20A* mutations have been identified in families with ERS [40–42]. We found no mutation in the *FAM20A* gene in our patient, and there are no reports of ERS secondary to mutations in the *FAM20A* gene.

Cetrullo et al. have reported two sisters affected by FHHNC with enamel hypoplasia, acute gingivitis, and periodontal bone loss [38,43]. Bardet et al. recently reported enamel abnormalities in FHHNC patients with *CLDN16* mutations [44]. These authors also identified a defect in the tight junction protein as a cause of dental disorder in a murine model, establishing the role of *CLDN16* in ameloblasts and its deficiency as potentially leading to abnormal enamel formation. Moreover, Yamaguti et al. reported the association of FHHNC with amelogenesis imperfecta in a patient with a *CLDN19* mutation [45]. These reports support the finding of a large *CLDN16* deletion in our patient to be the common link between amelogenesis imperfecta and FHHNC.

In conclusion, we described the first case of amelogenesis imperfecta in a boy with

FHHNC in which a large deletion of the *CLDN16* gene was identified by WES and the final molecular diagnosis was only established by the addition of PCR and MLPA analyses.

Acknowledgments

We are grateful to Francisco de Assis Rocha Neve from the University of Brasilia (UNB) for kindly providing the probes for MLPA, and to the team of the Endocrinology and Nephrology outpatient clinics and Laboratory of Molecular and Translational Endocrinology, particularly Ilda Sizue Kunii. We also thank the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) for the scholarships granted to V.R. and the São Paulo Research Foundation (FAPESP) and National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for the scholarships to M.M.L.K. (2012/01628-0, 2014/15948-2) and R.P.D. (160044/2013-8).

The protocol of this case report was previously approved by the institution's Research Ethics Committee (Nº 1.480.703), and a written informed consent for study and publication of the case was obtained from the patient's parents.

Table 1: Initial Laboratory tests.

PTH	Calcium	Phosphorus	25OHD	Potassium	Magnesium	24 hr Urinary Calcium
206 pg/mL	10.3 mg/dL	5.7 mg/dL	14 ng/mL	3.5 mEq/L	1.6 mg/dL	12.7mg/Kg/day
NR: 15-65	NR: 8.8 – 10.8	NR: 4.5 – 5.5	NR: > 30	NR: 3.5 – 6.3	NR: 1.7-2.3	NR:<4mg/Kg/day

NR: normal range



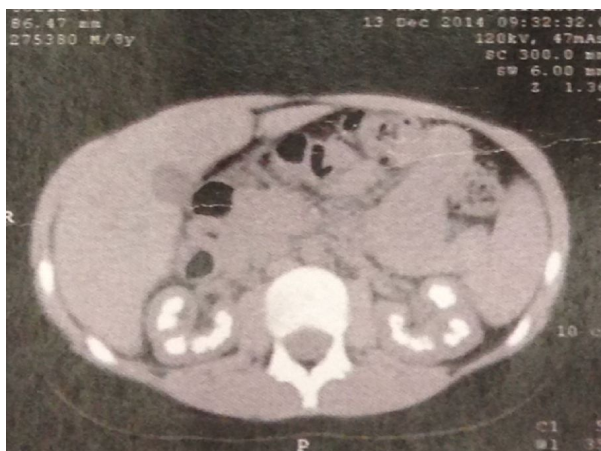


Figure 1. Main clinical features in a boy presenting with nephrocalcinosis and amelogenesis imperfecta. A) Dental enamel abnormalities. B) Diffuse renal parenchymal calcifications detected by unenhanced helical computed tomography.

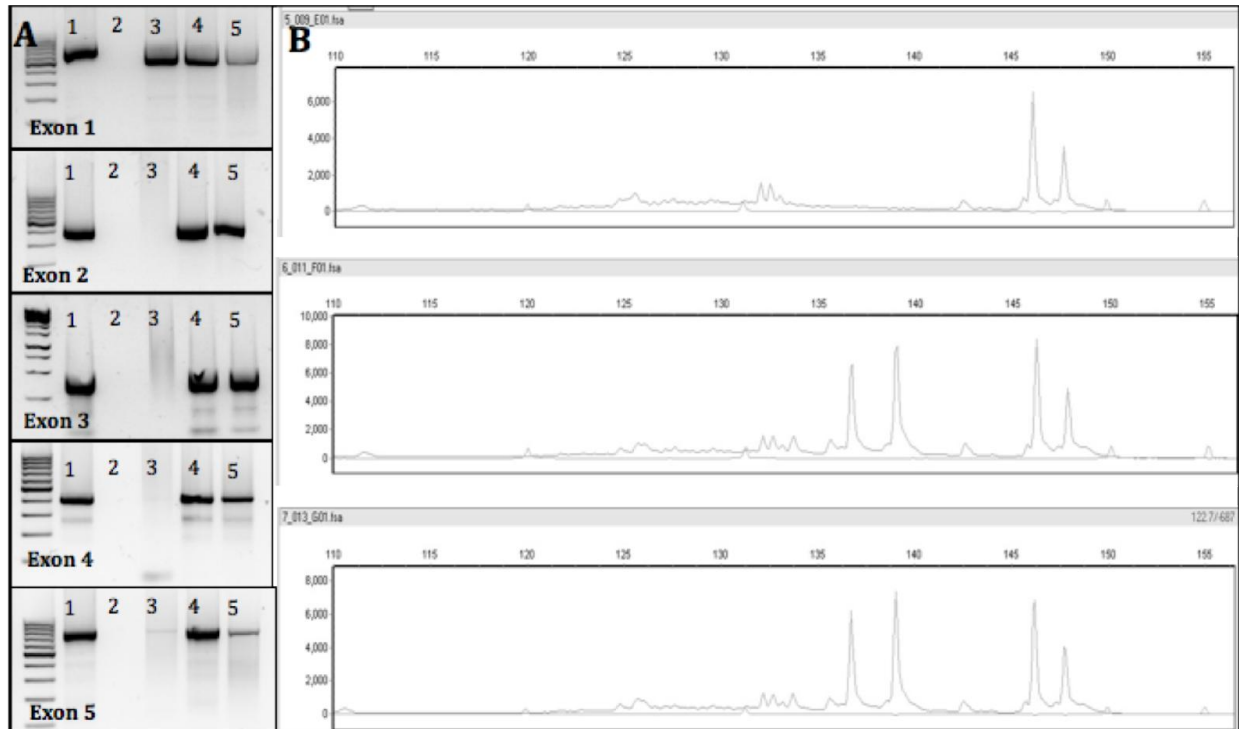


Figure 2. Molecular analysis for confirmation of a large *CLDN16* deletion detected in a boy presenting with nephrocalcinosis and amelogenesis imperfecta. Representation of PCR products on 1.5% agarose gel showing the PCR product of exons 1 to 5 on the control sample **1** (DNA of a healthy individual) and **2** (no DNA); **3**: proband with deletion of exons 2-5 of the *CLDN16* gene; **4-5** parents (heterozygotes). View of the PCR products by capillary electrophoresis on the probes for multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) designed against exons 3 and 5 of the *CLDN16* gene, kindly provided by the collaborator Francisco de Assis Rocha Neves from the University of Brasilia (UNB), according to an analysis conducted with the GeneMarker® program. The first two peaks indicated by the arrows refer to exons 3:5 that are absent in the homozygous proband (top panel) and present in the heterozygous parents (middle and lower panels).

References:

1. Rodriguez-Soriano J, Vallo A, García-Fuentes M. Hypomagnesaemia of hereditary renal origin. *Pediatr Nephrol.* 1987;1: 465–472. doi:10.1007/bf00849255
2. Praga M, Vara J, González-Parra E, Andrés A, Alamo C, Araque A, et al. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int.* 1995;47: 1419–1425. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7637271>
3. Simon DB. Paracellin-1, a Renal Tight Junction Protein Required for Paracellular Mg²⁺ Resorption. *Science.* 1999;285: 103–106. doi:10.1126/science.285.5424.103
4. Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, et al. 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.* 2006;79: 949–957. doi:10.1086/508617
5. Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M, et al. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest.* 2006;116: 878–891. doi:10.1172/JCI26323
6. Angelow S, Ahlstrom R, Yu ASL. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.*

- 2008;295: F867–76. doi:10.1152/ajprenal.90264.2008
7. Benigno V. Hypomagnesaemia-hypercalciuria-nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15: 605–610. doi:10.1093/ndt/15.5.605
 8. Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, et al. Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int*. 2001;59: 2206–2215. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00736.x
 9. Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Rönnefarth G, Böswald M, et al. Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12: 1872–1881. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518780>
 10. Godron A, Harambat J, Boccio V, Mensire A, May A, Rigother C, et al. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: phenotype-genotype correlation and outcome in 32 patients with CLDN16 or CLDN19 mutations. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7: 801–809. doi:10.2215/CJN.12841211
 11. Sikora P, Zaniew M, Haisch L, Pulcer B, Szczepańska M, Moczulska A, et al. Retrospective cohort study of familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis due to CLDN16 mutations. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30: 636–644. doi:10.1093/ndt/gfu374

12. Weber S, Hoffmann K, Jeck N, Saar K, Boeswald M, Kuwertz-Broeking E, et al. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet.* 2000;8: 414–422. doi:10.1038/sj.ejhg.5200475
13. Chan H-C, Estrella NMRP, Milkovich RN, Kim J-W, Simmer JP, Hu JC-C. Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds. *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1: 311–323. doi:10.1111/j.1600-0722.2011.00857.x
14. Pottel H. Measuring and estimating glomerular filtration rate in children. *Pediatr Nephrol.* 2017;32: 249–263. doi:10.1007/s00467-016-3373-x
15. Haisch L, Almeida JR, Abreu da Silva PR, Schlingmann KP, Konrad M. 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.* 2011;57: 320–330. doi:10.1053/j.ajkd.2010.08.038
16. Hou J, Goodenough DA. Claudin-16 and claudin-19 function in the thick ascending limb. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010;19: 483–488. doi:10.1097/MNH.0b013e32833b7125
17. Naderi ASA, Reilly RF Jr. Hereditary etiologies of hypomagnesemia. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2008;4: 80–89. doi:10.1038/ncpneph0680

18. Alexander RT, Hoenderop JG, Bindels RJ. Molecular determinants of magnesium homeostasis: insights from human disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19: 1451–1458. doi:10.1681/ASN.2008010098
19. Hanssen O, Castermans E, Bovy C, Weekers L, Erpicum P, Dubois B, et al. Two novel mutations of the CLDN16 gene cause familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Clin Kidney J*. 2014;7: 282–285. doi:10.1093/ckj/sfu019
20. Seeley HH, Loomba-Albrecht LA, Nagel M, Butani L, Bremer AA. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in three siblings having the same genetic lesion but different clinical presentations. *World J Pediatr*. 2012;8: 177–180. doi:10.1007/s12519-011-0295-3
21. Ferrè S, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Insight into renal Mg²⁺ transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20: 169–176. doi:10.1097/MNH.0b013e3283435ee4
22. Claverie-Martin F. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: clinical and molecular characteristics. *Clin Kidney J*. 2015;8: 656–664. doi:10.1093/ckj/sfv081
23. Coe FL, Canterbury JM, Firpo JJ, Reiss E. Evidence for Secondary Hyperparathyroidism in Idiopathic Hypercalciuria. *J Clin Invest*. 1973;52: 134–142. doi:10.1172/jci107156

24. Souberbielle J-C, Cavalier E, Cormier C. How to manage an isolated elevated PTH? *Ann Endocrinol* . 2015;76: 134–141. doi:10.1016/j.ando.2015.03.005
25. Suzuki Y, Ichikawa Y, Saito E, Homma M. Importance of increased urinary calcium excretion in the development of secondary hyperparathyroidism of patients under glucocorticoid therapy. *Metabolism*. 1983;32: 151–156. doi:10.1016/0026-0495(83)90221-4
26. Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, van den Heuvel LP, Jeck N, Vargas-Poussou R, et al. Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11: 1449–1459. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906158>
27. Wongsangsak S, Vidmar AP, Addala A, Kamil ES, Sequeira P, Fass B, et al. A novel SLC12A1 gene mutation associated with hyperparathyroidism, hypercalcemia, nephrogenic diabetes insipidus, and nephrocalcinosis in four patients. *Bone*. 2017;97: 121–125. doi:10.1016/j.bone.2017.01.011
28. Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*. 2010;61: 437–455. doi:10.1146/annurev-med-100708-204735
29. Falardeau F, Camurri MV, Campeau PM. Genomic approaches to diagnose rare bone disorders. *Bone*. 2017;102: 5–14. doi:10.1016/j.bone.2016.07.020

30. Yamaguti PM, dos Santos PAC, Leal BS, Santana VBB de M, Mazzeu JF, Acevedo AC, et al. Identification of the first large deletion in the CLDN16 gene in a patient with FHHNC and late-onset of chronic kidney disease: case report. *BMC Nephrol.* 2015;16: 92. doi:10.1186/s12882-015-0079-4
31. Kim J-W, Simmer JP, Lin BP-L, Seymen F, Bartlett JD, Hu JC-C. Mutational analysis of candidate genes in 24 amelogenesis imperfecta families. *Eur J Oral Sci.* 2006;114 Suppl 1: 3–12; discussion 39–41, 379. doi:10.1111/j.1600-0722.2006.00278.x
32. Hart PS. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 2004;41: 545–549. doi:10.1136/jmg.2003.017657
33. Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC-C, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem.* 2008;389. doi:10.1515/bc.2008.080
34. MacGibbon D. Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction. *Aust Dent J.* 1972;17: 61–63. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4504766>
35. Lubinsky M, Angle C, Marsh PW, Witkop CJ Jr. Syndrome of amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, impaired renal concentration, and possible abnormality of calcium metabolism. *Am J Med Genet.* 1985;20: 233–243. doi:10.1002/ajmg.1320200205
36. Ashkenazi M, Rafe Z, Sarnat H, Levin L. Nephrocalcinosis associated with continuous

- enamel hypoplasia and severe alveolar bone loss: a case report and literature review. *Pediatr Dent*. 2014;36: 250–253. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24960394>
37. Martelli-Júnior H, Neto PES, Aquino SN, Santos CC, Borges SP, Oliveira EA, et al. Amelogenesis Imperfecta and Nephrocalcinosis Syndrome: A Case Report and Review of the Literature. *Nephron Physiol*. 2011;118: 62–p65. doi:10.1159/000322828
38. Patel A, Jagtap C, Bhat C, Shah R. Bilateral nephrocalcinosis and amelogenesis imperfecta: A case report. *Contemp Clin Dent*. 2015;6: 262–265. doi:10.4103/0976-237X.156063
39. Kantaputra PN, Bongkochwilawan C, Kaewgahya M, Ohazama A, Kayserili H, Erdem AP, et al. Enamel-Renal-Gingival syndrome, hypodontia, and a novel FAM20A mutation. *Am J Med Genet A*. 2014;164A: 2124–2128. doi:10.1002/ajmg.a.36579
40. 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 Physiol*. 2012;122: 1–6. doi:10.1159/000349989
41. 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 Genet*. 2013;9: e1003302. doi:10.1371/journal.pgen.1003302
42. Kantaputra PN, Kaewgahya M. Enamel-renal-gingival syndrome and FAM20A mutations.

American Journal of. Wiley Online Library; 2014; Available:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.a.36187/full>

43. Cetrullo N, Guadagni MG, Piana G. Two cases of familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: dental findings. *Eur J Paediatr Dent.* 2006;7: 146–150.
Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17078738>
44. Bardet C, Courson F, Wu Y, Khaddam M, Salmon B, Ribes S, et al. Claudin-16 Deficiency Impairs Tight Junction Function in Ameloblasts, Leading to Abnormal Enamel Formation. *J Bone Miner Res.* 2016;31: 498–513. doi:10.1002/jbmr.2726
45. Yamaguti PM, Neves F de AR, Hotton D, Bardet C, de La Dure-Molla M, Castro LC, et al. Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations. *J Med Genet.* 2017;54: 26–37.
doi:10.1136/jmedgenet-2016-103956

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O objetivo principal deste estudo foi determinar o diagnóstico genético em paciente portador de nefrocalcinose, hiperparatireoidismo e amelogenesis imperfecta, através da análise do sequenciamento completo do exoma (WES), acompanhado no ambulatório de Fragilidades Ósseas do Hospital São Paulo da UNIFESP. Originalmente este paciente havia sido encaminhado ao ambulatório de cirurgia de cabeça e pescoço para tratamento cirúrgico com o diagnóstico de hiperparatireoidismo primário, que foi descartado e o paciente encaminhado para o ambulatório de fragilidades ósseas do Hospital São Paulo para esclarecimento diagnóstico.

Outro grande aprendizado obtido nesta investigação utilizando as atuais técnicas de pesquisa de variantes alélicas foi a dificuldade de identificar grandes deleções com o uso do WES. O uso de SNG para a decodificação do genoma humano trouxe um grande avanço no diagnóstico molecular de inúmeras doenças, por sua capacidade de sequenciar um grande número de genomas individuais, de forma rápida, precisa e com baixo custo, quando comparada aos métodos tradicionais de sequenciamento [82]. Desta forma, é possível almejar uma medicina de maior precisão, possibilitando o desenvolvimento de estratégias preventivas, diagnósticas e terapêuticas individualizadas.

Embora os éxons constituam apenas 1% de todo genoma, neles contém as principais informações para a síntese das proteínas, substâncias imprescindíveis para o normal funcionamento do organismo, sendo que mutações exônicas são responsáveis por 85% das doenças genéticas [78,83]. O WES tem-se revelado de grande utilidade na identificação de mutações novas e recorrentes, principalmente em doenças raras e de herança Mendeliana, sendo este o método escolhido por nós para alcançar o diagnóstico etiológico do nosso paciente.

Os principais genes candidatos eram aqueles relacionados ao diagnóstico diferencial de nefrocalcinose e hipomagnesemia, entre eles *CLDN16*, *CLDN19*, *SCL3A3*, *CLCN5*, *OCRL1*, *SLC12A1*, *KCNJ1*, *CLCNKB*, *BSND*, *FAM20A*, *ATP6N1B* e *ATP6B1* [84], sendo a *CLDN16* a mais provável. Entretanto, em uma primeira análise 105.390 variantes ou polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) foram descritas na lista de mutações, na qual não constava a *CLDN16*.

Dentre as variantes descritas, possíveis associações com a doença do paciente poderiam estar relacionadas com as variantes encontradas nos genes *SLC12A1* (p.Val958Ala; rs1552311; MAF 0.9) e *CLCNKB* (p.Ala287Val; rs7367494; MAF 0.3), entretanto, que nunca haviam sido descritas como patogênicas.

Ambos genes são responsáveis pelo transporte de Na/Cl no túbulo distal, associados à Síndrome de Bartter. O gene *SLC12A1* codifica o co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$ (NKCC2) na membrana apical da porção ascendente espessa da alça de Henle, que transporta o sódio de maneira ativa para fora da célula e o potássio para o intracelular. Sua mutação é responsável pela Síndrome de Bartter tipo I, doença de origem autossômica recessiva, que cursa com alcalose metabólica, hipocalemia, hipercalcúria e nefrocalcinose [85]. O gene *CLCNKB* que codifica o canal de cloro CLC-Kb, um dos responsáveis pelo transporte de cloro na membrana basal. Mutação no gene *CLCNKB* causa a Síndrome de Bartter tipo III, de origem autossômica recessiva, caracterizada por hipocalemia, alcalose metabólica, hiperaldosteronismo secundário com pressão arterial normal ou baixa ⁸⁰. A ausência de alcalose metabólica e de hipocalemia no nosso paciente, tornava improvável que uma dessas variantes fosse determinante para o diagnóstico.

O quadro clínico do nosso paciente era bastante compatível com a Hipomagnesemia familiar com hipercalcúria e nefrocalcinose (FHHNC), que é uma doença hereditária rara, de herança autossômica recessiva e que pode estar ligada a mutação das proteínas claudina-16 e/ou

claudina-19⁸¹. O gene *CLDN16*, está localizado no cromossomo 3, possui 5 éxons e codifica a claudina 16. Quando mutado, o gene *CLDN19*, (cromossomo 1 com 5 exons), além de induzir a FHHNC, provoca alterações oculares não observadas em nosso paciente. As duas proteínas são expressas nos rins, na porção ascendente espessa da alça de Henle, e sofrem heterodimerização, funcionando como barreira entre as células em regiões de grande interação entre elas conhecidas como *tight junction* ou junções celulares estreitas⁸². Nesta região, as claudinas regulam a permeabilidade paracelular guiada pela diferença de voltagem transepitelial, tornando-se responsável pela reabsorção de cátions divalentes como a Ca^{2+} e Mg^{2+} ^{83,84}.

A mutação com perda de função do gene *CLDN16* tem como característica, uma redução da reabsorção de magnésio e cálcio do lúmen tubular, ocasionando hipercalcúria, hipomagnesemia e nefrocalcinose com progressão para insuficiência renal crônica [25]. Ao diagnóstico, os principais sintomas incluem infecção urinária recorrente, poliúria, polidipsia, déficit no crescimento, vômitos e nefrolitíase²⁵.

Desde o início, mesmo com função renal preservada, os pacientes apresentam dosagens elevadas de PTH. Em 2001, Weber et al, descreveu uma série com 25 casos de FHHNC em que 88% deles apresentavam hiperparatireoidismo⁸⁵. Konrad em 2008, considerou que a etiopatogenia do hiperparatireoidismo, está relacionada a hipomagnesemia⁸². Evidências sugerem que o CASR pode servir não apenas como sensor de cálcio, mas também como sensor de magnésio, uma vez que mutações inativadoras deste gene estão associadas a elevação mesmo que discreta de magnésio sérico, enquanto mutações ativadoras podem cursar com hipomagnesemia⁸⁶. A correlação entre o PTH e o magnésio é semelhante ao que ocorre com o cálcio, porém com uma menor afinidade. Assim, baixo nível sérico de magnésio estimula a secreção de PTH pela ativação do CASR presente nas células principais para paratireóide⁸⁷. De forma paradoxal, como ocorre na mutação do TRPM6, níveis muito baixos de magnésio são

responsáveis pela redução na secreção de PTH, uma vez que o magnésio tem um importante papel na atividade da enzima Adenil-ciclase, responsável pela transformação da adenosina-trifosfato (ATP) em adenosina-monofosfato cíclico (AMPc), envolvido na secreção do PTH^{88, 89}.

A deficiência de vitamina D também estimula a secreção de PTH, uma vez que a hidroxilação da 25(OH)D em 1,25(OH)2D no rim é uma das ações do PTH⁹⁰. O nosso paciente, apresentou dosagem inicial de PTH de 216 pg/mL concomitante a uma deficiência de 25(OH)D de 14,4 ng/mL e após a normalização do nível de 25(OH)D para 32,9 ng/mL o PTH apresentou uma redução para 104,3 pg/mL porém, mantinha-se elevado.

Em 2013, Sikora et al, descreveram um caso de um menor de 15 anos com diagnóstico de FHHNC e insuficiência renal crônica que apresentou hiperparatireoidismo extremo e epifisiólise bilateral após a descontinuação do tratamento de suporte da homeostase eletrolítica. Apesar de rara, a epifisiólise costuma ocorrer em adolescentes púberes durante o estirão de crescimento. Na grande maioria dos casos é classificada como idiopática, mas pode ser secundária a trauma, radiação ou distúrbios endócrinos como hipogonadismo e hiperparatireoidismo⁹¹.

Recentemente foi sugerido que mutações com perda de função dos genes *CLDN16* e *CLDN19* estão envolvidas na *amelogenesis imperfecta*. Desde o início da amelogenese até a erupção do dente, a produção do esmalte passa por diversas fases. Na fase secretora, os ameloblastos, que são responsáveis pela formação e mineralização do esmalte, se ligam entre si por junções intercelulares dependente das proteínas claudinas, promovendo acesso paracelular restrito ao compartimento do esmalte⁷²⁻⁷⁴.

O tratamento de suporte inclui a administração de magnésio e diurético tiazídico com o objetivo de reduzir a excreção urinária de cálcio e o avanço da nefrocalcinose. A progressão para doença renal crônica é frequente, e ocorre em cerca de 30% dos casos até a adolescência⁹². O

transplante renal é o tratamento definitivo uma vez que o enxerto renal se mantém estável, sem recidiva de distúrbios metabólicos ou nefrocalcinose ^{25,93-95}.

A ausência de repercussão ocular indicava o gene *CLDN16* como favorito, excluído em uma primeira avaliação do WES. Resolvemos, então, buscar o arquivo BAM (*Binary Alignment/Map*) que é o formato de armazenamento dos dados de alinhamento, utilizado para verificar a cobertura de leitura, com o objetivo de certificar da cobertura deste gene ⁹⁵. (Anexo 2 e 3) O arquivo mostrou uma cobertura incompleta desse gene e para conferir esta informação, foi realizado uma reação de polimerase em cadeia (PCR), que apresentou amplificação apenas do primeiro éxon, indicando ausência dos éxons 2 a 5. Para confirmar esta grande deleção realizamos a técnica de MLPA, que é um método de PCR multiplex semi-quantitativo que detecta variação no número de cópias. Deleções ou duplicações do gene ou de parte dele são responsáveis por 10 a 30% das doenças ^{96,97}. O WES é cada vez mais utilizada para o diagnóstico de doenças raras, porém, possui como limitação a detecção de variação no número de cópias (CNV - *copy-number variation*), representadas pelas deleções e duplicações ⁹⁸. Atualmente, novos algoritmos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de aprimorar esta técnica ⁹⁹.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho podemos concluir que:

Nosso paciente é portador de Hipomagnesemia Hiper calciúrica Familiar com Nefrocalcinose ocasionada por grande deleção do gene *CLDN16*.

Amelogenesis imperfecta detectado no nosso paciente, foi recentemente reconhecida como parte da patologia.

A aplicação do WES à prática clínica e sua interpretação das variantes raras tem sido revolucionária, especialmente para o diagnóstico de doenças raras.

A técnica do WES ainda apresenta como limitação a detecção de CNV. Novos algoritmos estão sendo desenvolvidos para corrigir esta limitação.

Novas tecnologias não substituem o amplo conhecimento da fisiopatologia das doenças a serem estudadas, devendo estas complementarem a investigação clínica para alcançar o diagnóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, Lowry RB. Genetic disorders in children and young adults: a population study. *Am J Hum Genet.* 1988;42: 677–693.
2. United States. Congress. House. Committee on Energy and Commerce. Rare Diseases Orphan Product Development Act of 2002: report (to accompany H.R. 4014) (including cost estimate of the Congressional Budget Office). 2002.
3. Zuryski Y, Frith K, Leonard H, Elliott E. Rare childhood diseases: how should we respond? *Arch Dis Child.* 2008;93: 1071–1074.
4. Whicher D, Philbin S, Aronson N. An overview of the impact of rare disease characteristics on research methodology. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13: 14.
5. Boycott KM, Rath A, Chong JX, Hartley T, Alkuraya FS, Baynam G, et al. International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. *Am J Hum Genet.* 2017;100: 695–705.
6. Di Resta C, Galbiati S, Carrera P, Ferrari M. Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. *EJIFCC.* 2018;29: 4–14.
7. Shavit L, Jaeger P, Unwin RJ. What is nephrocalcinosis? *Kidney Int.* 2015;88: 35–43.
8. Virchow R. Kalk-Metastasen. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin.* 1855;8: 103–113.
9. Sayer JA, Carr G, Simmons NL. Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clin Sci .* 2004;106: 549–561.
10. Alon US. Nephrocalcinosis. *Curr Opin Pediatr.* 1997;9: 160–165.

11. Daeschner CW, Singleton EB, Curtis JC. Urinary tract calculi and nephrocalcinosis in infants and children. *J Pediatr*. 1960;57: 721–732.
12. Rönnefarth G, Misselwitz J. Nephrocalcinosis in children: a retrospective survey. Members of the Arbeitsgemeinschaft für pädiatrische Nephrologie. *Pediatr Nephrol*. 2000;14: 1016–1021.
13. Mantan M, Bagga A, Viridi VS, Menon S, Hari P. Etiology of nephrocalcinosis in northern Indian children. *Pediatr Nephrol*. 2007;22: 829–833.
14. Ammenti A, Pelizzoni A, Cecconi M, Molinari PP, Montini G. Nephrocalcinosis in children: a retrospective multi-centre study. *Acta Paediatr*. 2009;98: 1628–1631.
15. Bartter FC, Rodriguez JA. Bartter's Syndrome. *Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde/ Advances in Internal Medicine and Pediatrics*. 1982. pp. 79–103.
16. Schurman SJ, Shoemaker LR. Bartter and Gitelman syndromes. *Adv Pediatr*. 2000;47: 223–248.
17. Rodriguez Soriano J. Renal Tubular Acidosis: The Clinical Entity. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13: 2160–2170.
18. Cheidde L, Vieira TC, Lima PRM, Saad STO, Heilberg IP. A novel mutation in the anion exchanger 1 gene is associated with familial distal renal tubular acidosis and nephrocalcinosis. *Pediatrics*. 2003;112: 1361–1367.
19. Pereira P, Miranda D, Oliveira E, Simoes e Silva A. Molecular Pathophysiology of Renal Tubular Acidosis. *Curr Genomics*. 2009;10: 51–59.
20. Morey M, Castro-Feijóo L, Barreiro J, Cabanas P, Pombo M, Gil M, et al. Genetic diagnosis of X-linked dominant hypophosphatemic rickets in a cohort study: Tubular reabsorption of phosphate and 1,25(OH)₂D serum levels are associated with PHEX mutation type. *BMC Med Genet*. 2011;12. doi:10.1186/1471-2350-12-116
21. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*. 2006;38: 1310–1315.
22. Bergwitz C, Roslin NM, Tieder M, Loredó-Osti JC, Bastepe M, Abu-Zahra H, et al.

- SLC34A3 mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria predict a key role for the sodium-phosphate cotransporter NaPi-IIc in maintaining phosphate homeostasis. *Am J Hum Genet.* 2006;78: 179–192.
23. Ichikawa S, Sorenson AH, Imel EA, Friedman NE, Gertner JM, Econs MJ. Intronic deletions in the SLC34A3 gene cause hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91: 4022–4027.
 24. Rodríguez-Soriano J, Vallo A, García-Fuentes M. Hypomagnesaemia of hereditary renal origin. *Pediatr Nephrol.* 1987;1: 465–472.
 25. Praga M, Vara J, González-Parra E, Andrés A, Alamo C, Araque A, et al. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int.* 1995;47: 1419–1425.
 26. Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, et al. 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.* 2006;79: 949–957.
 27. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 2013;93: 525–569.
 28. Cho HY, Lee BH, Choi HJ, Ha IS, Choi Y, Cheong HI. Renal manifestations of Dent disease and Lowe syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2007;23: 243–249.
 29. Devuyst O, Thakker RV. Dent's disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5: 28.
 30. Şimşek E, Şimşek T, Dallar Y, Can Ö, Willems PJ. A novel pathogenic DNA variation in the OCRL1 gene in Lowe syndrome. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2011;3: 29–31.
 31. Harambat J, Fargue S, Bacchetta J, Acquaviva C, Cochat P. Primary hyperoxaluria. *Int J Nephrol.* 2011;2011: 864580.
 32. Tang X, Bergstralh EJ, Mehta RA, Vrtiska TJ, Milliner DS, Lieske JC. Nephrocalcinosis is a risk factor for kidney failure in primary hyperoxaluria. *Kidney Int.* 2015;87: 623–631.
 33. Hoppe B, Beck BB, Milliner DS. The primary hyperoxalurias. *Kidney Int.* 2009;75: 1264–1271.

34. Pober BR. Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med*. 2010;362: 239–252.
35. Castleman B, Roth SI, Munro Neville A. Tumors of the Parathyroid Glands. (Atlas of Tumor Pathology. Second Series, Fascicle 14.). *Am J Surg Pathol*. 1980;4: 305.
36. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*. 1993;366: 575.
37. Hauache OM. Extracellular calcium-sensing receptor: structural and functional features and association with diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34: 577–584.
38. Venail F, Nicollas R, Morin D, Mackle T, Garnier JM, Triglia J-M, et al. Solitary parathyroid adenoma: a rare cause of primary hyperparathyroidism in children. *Laryngoscope*. 2007;117: 946–949.
39. Cronin CS, Reeve TS, Robinson B, Clifton-Bligh P, Guinea A, Delbridge L. Primary hyperparathyroidism in childhood and adolescence. *J Paediatr Child Health*. 1996;32: 397–399.
40. Starker LF, Akerström T, Long WD, Delgado-Verdugo A, Donovan P, Udelsman R, et al. Frequent germ-line mutations of the MEN1, CASR, and HRPT2/CDC73 genes in young patients with clinically non-familial primary hyperparathyroidism. *Horm Cancer*. 2012;3: 44–51.
41. Zajickova K, Vrbikova J, Canaff L, Pawelek PD, Goltzman D, Hendy GN. Identification and functional characterization of a novel mutation in the calcium-sensing receptor gene in familial hypocalciuric hypercalcemia: modulation of clinical severity by vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92: 2616–2623.
42. Christensen SE, Nissen PH, Vestergaard P, Mosekilde L. Familial hypocalciuric hypercalcaemia: a review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011;18: 359–370.
43. Reh CMS, Hendy GN, Cole DEC, Jeandron DD. Neonatal hyperparathyroidism with a heterozygous calcium-sensing receptor (CASR) R185Q mutation: clinical benefit from cinacalcet. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96: E707–12.
44. Giusti F, Tonelli F, Brandi ML. Primary hyperparathyroidism in multiple endocrine

- neoplasia type 1: when to perform surgery? *Clinics* . 2012;67 Suppl 1: 141–144.
45. Alevizaki M, Saltiki K. Primary Hyperparathyroidism in MEN2 Syndromes. *Recent Results Cancer Res*. 2015;204: 179–186.
 46. Magalhães PKR, Antonini SRR, de Paula FJA, de Freitas LCC, Maciel LMZ. Primary hyperparathyroidism as the first clinical manifestation of multiple endocrine neoplasia type 2A in a 5-year-old child. *Thyroid*. 2011;21: 547–550.
 47. Redwin Dhas MP, Karthiga KS, Tatu JE, Eugenia SJ. Hyper Parathyroidism Jaw Tumor Syndrome: A Rare Condition of Incongruous Features. *Ethiop J Health Sci*. 2017;27: 309–313.
 48. Silver J, Kilav R, Naveh-Many T. Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2002. pp. F367–F376.
doi:10.1152/ajprenal.00061.2002
 49. Cunningham J, Locatelli F, Rodriguez M. Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, disease progression, and therapeutic options. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6: 913–921.
 50. Galitzer H, Ben-Dov IZ, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2010;77: 211–218.
 51. Crawford PJM, Aldred M, Bloch-Zupan A. Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2: 17.
 52. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The Structural Biology of the Developing Dental Enamel Matrix. *J Struct Biol*. 1999;126: 270–299.
 53. Suckling GW. Developmental defects of enamel--historical and present-day perspectives of their pathogenesis. *Adv Dent Res*. 1989;3: 87–94.
 54. Bronckers ALJJ, Lyaruu DM, DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res*. 2009;88: 877–893.
 55. Pindborg JJ. Aetiology of developmental enamel defects not related to fluorosis. *Int Dent J*. 1982;32: 123–134.
 56. Nanci A, Mocetti P, Sakamoto Y, Kunikata M, Lozupone E, Bonucci E. Morphological and

- immunocytochemical analyses on the effects of diet-induced hypocalcemia on enamel maturation in the rat incisor. *J Histochem Cytochem*. 2000;48: 1043–1058.
57. Proctor R, Kumar N, Stein A, Moles D, Porter S. Oral and dental aspects of chronic renal failure. *J Dent Res*. 2005;84: 199–208.
 58. Rajpar MH, Harley K, Laing C, Davies RM, Dixon MJ. Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 2001;10: 1673–1677.
 59. Chan H-C, Estrella NMRP, Milkovich RN, Kim J-W, Simmer JP, Hu JC-C. Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds. *Eur J Oral Sci*. 2011;119 Suppl 1: 311–323.
 60. Kida M, Ariga T, Shirakawa T, Oguchi H, Sakiyama Y. Autosomal-dominant hypoplastic form of amelogenesis imperfecta caused by an enamelin gene mutation at the exon-intron boundary. *J Dent Res*. 2002;81: 738–742.
 61. Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC-C, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem*. 2008;389: 695–700.
 62. Wright JT, Torain M, Long K, Seow K, Crawford P, Aldred MJ, et al. Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families. *Cells Tissues Organs*. 2011;194: 279–283.
 63. MacGibbon D. Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction. *Aust Dent J*. 1972;17: 61–63.
 64. Lubinsky M, Angle C, Wayne Marsh P, Witkop CJ, Opitz JM, Reynolds JF. Syndrome of amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, impaired renal concentration, and possible abnormality of calcium metabolism. *Am J Med Genet*. 1985;20: 233–243.
 65. Cetrullo N, Guadagni MG, Piana G. Two cases of familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: dental findings. *Eur J Paediatr Dent*. 2006;7: 146–150.
 66. Ashkenazi M, Rafe Z, Sarnat H, Levin L. Nephrocalcinosis associated with continuous enamel hypoplasia and severe alveolar bone loss: a case report and literature review. *Pediatr Dent*. 2014;36: 250–253.

67. 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. *Am J Hum Genet.* 2011;88: 616–620.
68. Cho SH, Seymen F, Lee K-E, Lee S-K, Kweon Y-S, Kim KJ, et al. Novel FAM20A mutations in hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Hum Mutat.* 2011;33: 91–94.
69. 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 Physiol.* 2012;122: 1–6.
70. Kantaputra PN, Bongkochwilawan C, Kaewgahya M, Ohazama A, Kayserili H, Erdem AP, et al. Enamel-Renal-Gingival syndrome, hypodontia, and a novel FAM20A mutation. *Am J Med Genet A.* 2014;164A: 2124–2128.
71. de la Dure-Molla M, Quentric M, Yamaguti PM, Acevedo A-C, Mighell AJ, Vikkula M, et al. Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9: 84.
72. Bardet C, Courson F, Wu Y, Khaddam M, Salmon B, Ribes S, et al. Claudin-16 deficiency impairs tight junction function in ameloblasts, leading to abnormal enamel formation. *J Bone Miner Res.* 2016;31: 498–513.
73. Bardet C, Ribes S, Wu Y, Diallo MT, Salmon B, Breiderhoff T, et al. Claudin Loss-of-Function Disrupts Tight Junctions and Impairs Amelogenesis. *Front Physiol.* 2017;8: 326.
74. Yamaguti PM, Neves F de AR, Hotton D, Bardet C, de La Dure-Molla M, Castro LC, et al. Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations. *J Med Genet.* 2017;54: 26–37.
75. Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B, Schoch K, Vellore K, McDonald M, et al. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet Med.* 2014;16: 176–182.
76. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the.* 2009. Available:

<https://www.pnas.org/content/106/45/19096.short>

77. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet*. 2011;48: 580–589.
78. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*. 2013;369: 1502–1511.
79. Dorn C, Grunert M, Sperling SR. Application of high-throughput sequencing for studying genomic variations in congenital heart disease. *Brief Funct Genomics*. 2014;13: 51–65.
80. Kuperberg M, Lev D, Blumkin L, Zerem A, Ginsberg M, Linder I, et al. Utility of Whole Exome Sequencing for Genetic Diagnosis of Previously Undiagnosed Pediatric Neurology Patients. *J Child Neurol*. 2016;31: 1534–1539.
81. Sheppard S, Biswas S, Li MH, Jayaraman V, Slack I, Romasko EJ, et al. Utility and limitations of exome sequencing as a genetic diagnostic tool for children with hearing loss. *Genet Med*. 2018;20: 1663–1676.
82. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett*. 2013;340: 284–295.
83. Rabbani B, Tekin M, Mahdih N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet*. 2014;59: 5–15.
84. Moe OW, Bonny O. Genetic hypercalciuria. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16: 729–745.
85. Markadieu N, Delpire E. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflugers Arch*. 2014;466: 91–105.

ANEXOS

ANEXO 1 - Densitometria Óssea

Referring Physician: ENDOCRINO

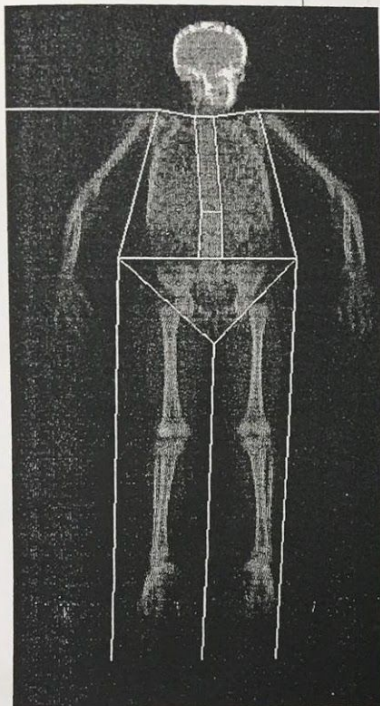


Image not for diagnostic use
k = 1.178, d0 = 47.8
318 x 122

Scan Information:

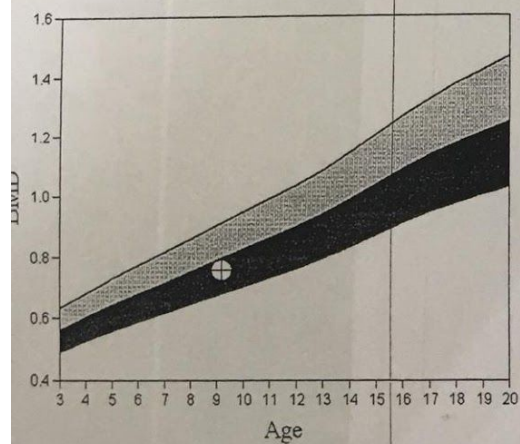
Scan Date: 17 March 2015 ID: A0317150M
Scan Type: a Whole Body
Analysis: 24 March 2015 10:31 Version 13.3:5
Auto Whole Body
Operator: GENI
Model: Discovery Wi (S/N 85824)
Comment:

DXA Results Summary:

Region	Area (cm ²)	BMC (g)	BMD (g/cm ²)	T - score	PR (%)	Z - score
L Arm	105.95	53.08	0.501			
R Arm	104.00	52.15	0.501			
L Ribs	84.45	45.85	0.543			
R Ribs	89.92	46.48	0.517			
T Spine	53.17	25.98	0.489			
L Spine	25.41	18.31	0.720			
Pelvis	96.18	68.88	0.716			
L Leg	197.04	138.46	0.703			
R Leg	201.35	150.19	0.746			
Subtotal	957.47	599.38	0.626			
Head	195.87	272.06	1.389			
Total	1153.34	871.44	0.756		61	-0.7

Total BMD CV 1.0%, ACF = 1.031, BCF = 1.001

Total



Comment:

Referring Physician: ENDOCRINO

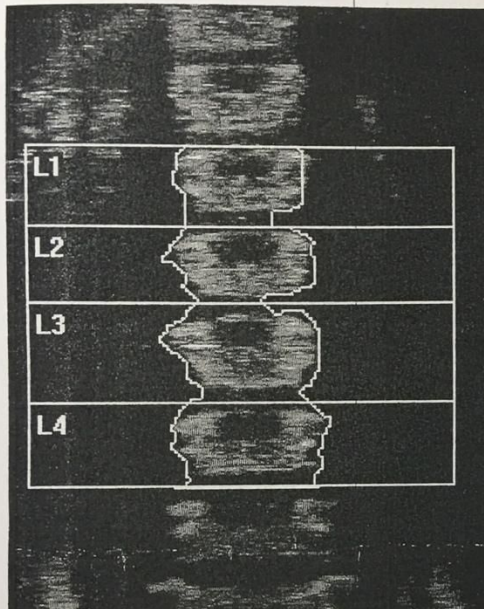


Image not for diagnostic use
k = 1.127, d0 = 49.1
112 x 94

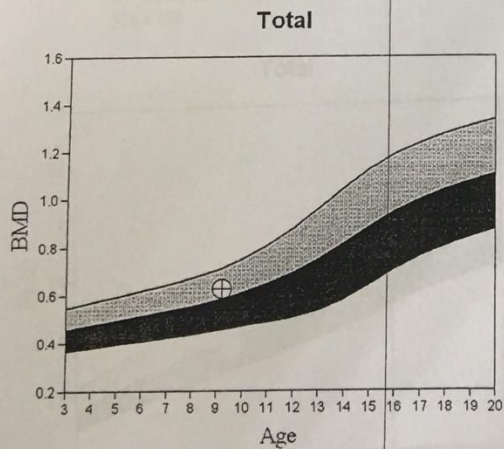
Scan Information:

Scan Date: 17 March 2015 ID: A0317150L
Scan Type: f Lumbar Spine
Analysis: 24 March 2015 10:33 Version 13.3:5
Lumbar Spine (auto low density)
Operator: GENI
Model: Discovery Wi (S/N 85824)
Comment:

DXA Results Summary:

Region	Area (cm ²)	BMC (g)	BMD (g/cm ²)	T - score	PR (%)	Z - score
L1	6.81	3.53	0.519		50	-0.1
L2	7.03	4.21	0.599		54	0.2
L3	9.29	6.02	0.648		58	0.6
L4	9.13	6.31	0.691		63	1.3
Total	32.27	20.08	0.622		57	0.6

Total BMD CV 1.0%, ACF = 1.031, BCF = 1.001, TH = 5.892



Comment:

T-score vs. Pediatric Male; Z-score vs. Pediatric Male. Source: Hologic, 2005

ANEXO 2

Informações complementares - Metodologia

Sequenciamento genômico completo do tipo exoma (WES)

O DNA total foi isolado da amostra de sangue periférico e submetido a Sequenciamento total tipo exoma (WES) realizado por EdgeBio (Gaithersburg, MD, EUA) usando a plataforma Illumina HiSeq 2000 (Illumina®, Inc., San Diego, CA, EUA). A biblioteca de DNA foi construída usando o Kit de Preparação de Amostras de DNA Illumina TruSeq (Illumina®, Inc., San Diego, CA, EUA) e os exons foram capturados com SeqCap EZ Human Exoma Kit v3.0 (Roche NimbleGen, Madison, WI, EUA). Após sequenciamento, a leitura das sequências foi realizada pela plataforma HiSeq2000 (Illumina, Inc, San Diego, CA, USA) e realizado alinhamento e detecção de variantes com base de SNP do National Center for Biotechnology Information (NCBI), INDEL e OMIM para identificar variações no exoma que eventualmente poderiam estar relacionado com a patologia do paciente. As variantes foram interpretadas considerando-se o quadro clínico do paciente e excluídos aquelas com uma frequência alélica menor de 0,05 ($MAF < 0,1$) e aquelas variantes de significado clínico desconhecido (VUS).

Tabela de variantes em genes candidatos e de seus parálogos encontrados envolvendo características clínicas do paciente em anexo.

Extração de DNA, PCR (reação em cadeia de polimerase) convencional e sequenciamento do gene *CLDN16*:

Foi realizado extração de DNA, pelo método in house, das amostras do paciente, de seus familiares (pai, mãe e irmã) e de uma pessoa saudável como controle positivo. Para o controle negativo foi realizado água. O primer para o gene *CLDN16* utilizado encontra-se em anexo. Os protocolos de PCR foram realizados com preparações de DNA de amostras do paciente, de seus pais, de sua irmã, de um controle positivo e um controle negativo. Para as reações, um termociclador foi utilizado. Cada reação de PCR foi composta de (PCR buffer 10X, MgCl₂, DNTPS mix, Taq platinum, Água, Primer F, Primer R e DNA em um volume total de 25µl. As reações de PCR foram realizadas com 38 ciclos de 5 min à 95^o e 30" à 94^o para o processo de desnaturação, 30" à 61^o para o processo de anelamento, seguido por um passo de extensão de 45" à 72^o e 10min à 72^o. Os produtos de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,8%, corados com corante azul (6xDNA Loading Dye). Após a aplicação das amostras, realizado o encaixe dos cabos de conexão com a fonte de corrente contínua com voltagem de 100 V e amperagem de 400 mA por 30 minuto. Utilizado para leitura do gel o Gel Doc TM EZ Gel Documentation System.

Primer do gene CLDN16 utilizado para a realização do PCR:

2307-CLDN16-EX1-F	GTTTCACCAGTGGCCTGTCT	20 60.18 55.00	699 pb
2308-CLDN16-EX1-R	GGCTGGCCTGGATCATGAAA	20 60.40 55.55	
2309-CLDN16-EX2-F	AGGCTTCAATTGTCAGTGCTT	21 58.41 42.86	436 pb
2310-CLDN16-EX2-R	CGAGATGAGCTCAATTTCTAACCA	24 58.89 41.67	
2311-CLDN16-EX3-F	ATGCTCTCTGCTAGCATACCAA	22 59.30 45.45	487 pb
2312-CLDN16-EX3-R	CTCTCCTTCACCTCAAGCCC	20 59.75 60.00	

2313-CLDN16-EX4-F	AGAGACAGAAGAAGTGTCCGAAG	23 59.19 47.83	398 pb
2314-CLDN16-EX4-R	ACGATAGTGGAGGCAAGGAA	20 59.69 50.00	
2315-CLDN16-EX5-F	CTAAGGGAATACCTCTCCTGATGAA	25 59.16 44.00	751 pb
2316-CLDN16-EX5-R	TAGGGTCCCTGGCCTCTTTG	20 60.91 60.00	

Análise molecular e amplificação por sonda dependente de ligação múltipla (MLPA)

Para análise molecular, o sangue venoso foi coletado e o DNA genômico foi isolado dos leucócitos usando Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard (Promega; Madison, WI, EUA). Os fragmentos de DNA das regiões codificadoras do gene *CLDN16* e os limites exon-intron foram amplificados usando conjuntos de primers específicos para genes (conjuntos de primers *CLDN16* foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Francisco de Assis Rocha Neves / Universidade de Brasília). As sondas sintéticas foram projetadas para o exon 3 e 5 para confirmar a suspeita de uma deleção parcial do gene *CLDN16*. As reações de MLPA foram realizadas seguindo o protocolo padrão (protocolo MRC-Holland; <http://www.mlpa.com>). Os dados de rastreamento foram analisados utilizando o software Gene Mapper v4.0 (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA), e as áreas e alturas de pico integradas foram exportadas para uma planilha Excel (Microsoft; Silicon Valley, CA, EUA). Para cada amostra, as alturas dos picos foram primeiro normalizadas para a altura média dos picos das sondas de controle, seguida de normalização para a altura média dos picos das amostras controle, obtidas de pacientes saudáveis e não relacionados, incluídos na corrida.

ANEXO 3

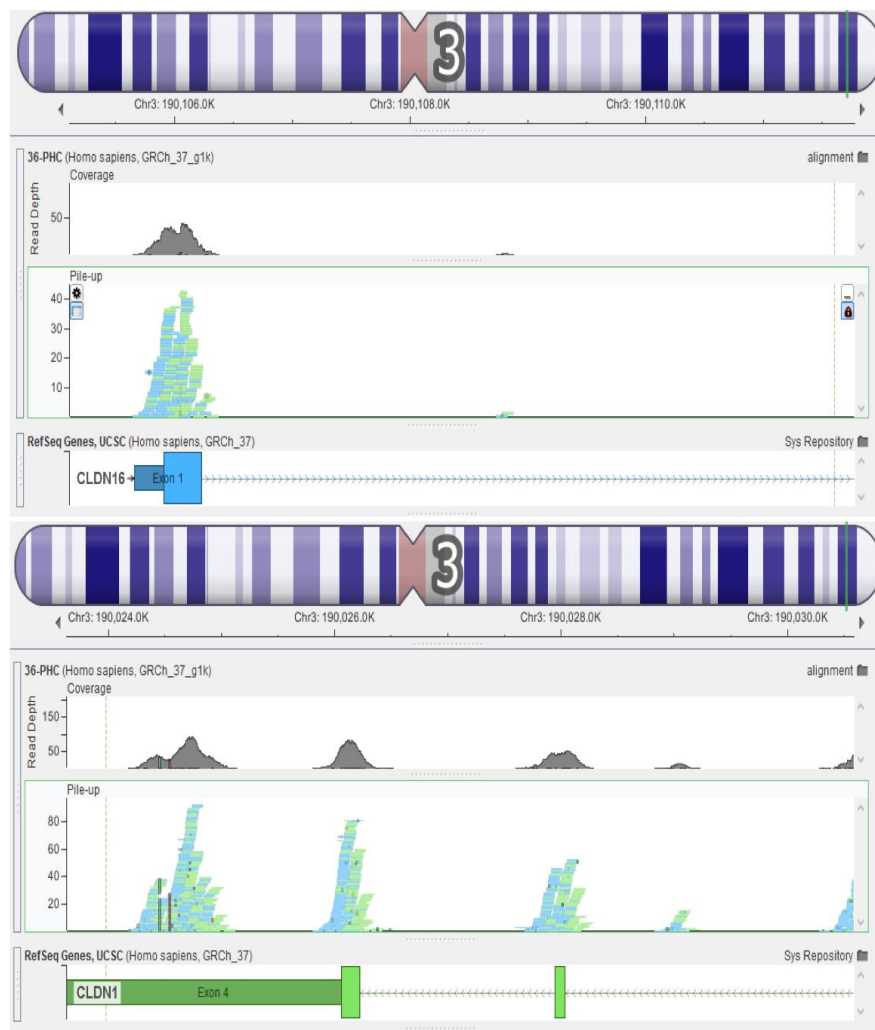


Figura 1: Visualização do arquivo BAM (*Binary of Sequence Alignment and Mapping*). Estudo do arquivo BAM pelo programa *UCSC Genome Browser* obtido do sequenciamento de última geração (*Next Generation Sequencing*) do probando relativo ao locus 3q27-29 onde está localizado os genes *CLDN16* e *CLDN1*.

ANEXO 4 – Submissão artigo

Clinical Cases in mineral and bone metabolism: Submitted article CCMBM-2019-04858

[Caixa de entrada](#)



23 de março de 2019
11:27

Clinical Cases in mineral and bone metabolism

<info@gruppcic.it>

Para: Vanessa Radonsky <dravanessaradonsky@gmail.com>

[Responder](#) | [Responder a todos](#) | [Encaminhar](#) | [Imprimir](#) | [Excluir](#) | [Mostrar original](#)

Submitted article A large CLDN16 exon deletion causing severe nephrocalcinosis, hyperparathyroidism and amelogenesis in a child

Thank you for having submitted your article

You can follow the revision process form the 'Submissions Being Processed' list.

We'll contact you as soon as we have news.

Best wishes

Clinical Cases in mineral and bone metabolism

author.ccmbm.com

APÊNDICE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Voluntário/responsável legal: _____

Idade: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Investigador Principal: Dra Vanessa Radonsky

Co-investigadores: Dra Marise Lazaretti Castro, Dr. Magnus Régios Dias da Silva, Dra Ita Pfeferman Heiberg

CANALOPATIAS ENDÓCRINAS: ESTUDO DE GENES RELACIONADOS A HIPERCALCIÚRIA E NEFROCALCINOSE QUE CURSAM COM HIPERPARATIROIDISMO SECUNDÁRIO EM UM PACIENTE.

Estas informações estão sendo fornecidas de maneira clara e simples para sua participação voluntária neste estudo. Portanto, leia este termo com atenção e pergunte aos pesquisadores responsáveis sobre quaisquer dúvidas, sempre que considerar necessário. Após a leitura, caso concorde voluntariamente em participar, assine-o em duas vias e mantenha uma em seu poder.

Este estudo tem por objetivo investigar os genes envolvidos na causa da nefrocalcinose e hipercalcúria – grande quantidade de cálcio na urina - em pacientes e familiares possivelmente afetados, além de correlacionar tais dados com as características clínicas.

O diagnóstico geralmente só é possível por meio de testes laboratoriais, que são as dosagens de eletrólitos e hormônios no sangue: cálcio, fósforo, cloro, magnésio, paratormônio, e na urina: cálcio, magnésio, potássio, cloro e também a análise de material genético DNA/RNA, uma vez que manifestações clínicas de hipercalcúria – cálcio elevado na urina - são facilmente confundidas com outras doenças.

O diagnóstico da doença estudada – hipercalcúria com nefrocalcinose é importante pois promove um tratamento adequado além do aconselhamento genético. Assim, é importante o exame de sangue, no qual o material genético (DNA/RNA) será examinado pelos pesquisadores e investigadores do Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional (Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina), para identificação de alteração genética quando possível gene associado a hipercalcúria e nefrocalcinose. Para o exame da pesquisa de possíveis mutações, serão coletados cerca de 5 mL de sangue através de punção de veia no

braço. A coleta de sangue é um procedimento de rotina e não apresenta riscos à saúde. Algumas vezes pode ocorrer o aparecimento de um pequeno hematoma no local da punção o que se resolve espontaneamente em alguns dias.

Dado que os casos de hipercalcúria e nefrocalcinose podem ser transmitidos de forma hereditária, no caso do material genético (DNA/RNA) apresentar variação, poderá ser informado aos familiares o risco deles também apresentarem a mesma. Em quaisquer situações, respeitaremos o interesse ou o não-interesse do voluntário ou responsável legal de conhecer esse resultado.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Todas as informações obtidas sobre cada voluntário (e/ou seus familiares) para este estudo serão analisadas em conjunto e consideradas confidenciais, não sendo reveladas para outros que não sejam os pesquisadores e médicos envolvidos. Dados que possam identificar o voluntário (e/ou seus familiares), como nome, serão mantidos em um arquivo separado das demais informações do estudo. O material biológico (sangue) e todas as demais informações sobre o voluntário (e/ou seus familiares) serão identificados somente por números.

Não há despesas pessoais para o voluntário em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelo procedimento de punção da veia do antebraço neste estudo (nexo causal comprovado), o voluntário tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos pesquisadores responsáveis pelo estudo para esclarecimento de eventuais dúvidas. A investigadora principal é a: Dra. Vanessa Radonsky, telefone para contato 11-996238166. Todos os pesquisadores responsáveis pelo estudo podem ser encontrados nos endereços: Laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional (Rua Pedro de Toledo, 669 – 11º andar) e no do Ambulatório de Doenças Osteometabólicas- (Rua Borges Lagoa, 800). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar

– cj. 14 – São Paulo/SP telefone: (11) 55711062, fax: (11) 55397162

Comprometemo-nos em utilizar os dados, as amostras de sangue e os resultados obtidos

somente para esta pesquisa. Todavia, ressaltamos a necessidade de armazenamento de amostras de material biológico (DNA e/ou RNA do sangue). O paciente e/ou responsável deverá ser contatado para obtenção de TCLE para o uso do material em novo projeto e o pedido de permissão para seu uso futuro deverá ser submetido e aprovado pelo CEP–UNIFESP. Em caso de não-localização do paciente e/ou responsável (doador falecido, tentativas anteriores de contato sem sucesso ou outros), as justificativas devem ser apresentadas como parte do protocolo para apreciação do CEP–UNIFESP.

Eu declaro que fui suficientemente informado a respeito das informações que li, descrevendo o estudo: Canalopatia Endócrina: Estudo de Genes Relacionados a Hipercalciúria e Nefrocalcinose que Cursam com Hiperparatireoidismo Secundário em um paciente.

Eu discuti com um dos pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de armazenamento de dados e material biológico (DNA/RNA), e de esclarecimentos permanentes sobre estudos futuros. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do voluntário

RG _____

Assinatura representante legal

RG _____

Data ____/____/____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO
PAULO UNIFESP-HSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CANALOPATIAS ENDOCRINAS: ESTUDO DE GENES RELACIONADOS A HIPERCALCIÚRIA E NEFROCALCINOSE QUE CURSAM COM HIPERPARATIROIDISMO SECUNDÁRIO EM UM PACIENTE.

Pesquisador: Vanessa Radonsky

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54035915.0.0000.5505

Instituição Proponente: Escola Paulista de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.576.108

Apresentação do Projeto:

Trata-se de respostas de pendências apontadas no parecer inicial.

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Número do Parecer: 1.480.703

DADOS DO PARECER

Projeto CEP/UNIFESP n: 0218/2016

Canalopatias endócrinas referem-se a mutações em canais iônicos que agem como proteínas de transporte de membrana como poros, canais fechados e bombas, que ao reagir aos sinais de impulso elétrico, realizam importantes funções na secreção hormonal, transporte transepitelial e sinalização do cálcio. Disfunção de vários genes que codificam os canais iônicos podem cursar com hipercalciúria e nefrocalcinose. Pretendemos buscar a causa genética em um caso de um paciente de 6 anos acompanhado pela Endocrinologia conjuntamente com a Nefrologia que apresenta hipercalciúria com nefrocalcinose, ainda sem diagnóstico etiológico para estas alterações. A hipercalciúria na infância pode

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.576.108

causar poliúria, hematúria não glomerular, disúria associada ou não à infecção do trato urinário, dor abdominal, nefrolitíase e/ou nefrocalcinose, culminando com perda da função renal. A realização de investigação molecular nestes casos é de fundamental importância. Pretendemos utilizar os recursos disponíveis em técnicas moleculares, como exoma e outros métodos complementares em busca de uma mutação em nosso paciente. Esta definição poderá interferir no seu planejamento terapêutico assim como em seu prognóstico e aconselhamento genético futuro.

Objetivo da Pesquisa:

- Hipótese: Presença de mutações em canais iônicos. Disfunção de vários genes que codificam os canais iônicos podem cursar com hipercalcúria e nefrocalcinose. Pretendemos buscar a causa genética em um caso de um paciente de 6 anos acompanhado pela endocrinologia conjuntamente com a Nefrologia que apresenta hipercalcúria com

nefrocalcinose, ainda sem diagnóstico etiológico para estas alterações.

-Objetivo Primário: Pesquisar possíveis mutações que podem estar relacionadas com o quadro clínico do paciente PHC.

-Objetivo Secundário: Rastrear mutações em genes candidatos associados à Hipercalcúria e Nefrocalcinose através da técnica do Exoma. Realização de estudo molecular necessário para confirmação e validação da mutação encontrada no paciente e em seus familiares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de respostas de pendências

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo com o objetivo acadêmico de Mestrado, vinculado ao Departamento de Endocrinologia, Campus Vila Clementino, com orientação da profa. Dra. Marise Lazaretti Castro. TIPO DE ESTUDO: Estudo descritivo baseado em um caso clínico. Pretende-se buscar a causa genética em um caso de um paciente de 6 anos. Pretende-se utilizar os recursos disponíveis em técnicas moleculares, como exoma e outros métodos complementares em busca de uma mutação em nosso paciente. Esta definição poderá interferir no seu planejamento terapêutico assim como em seu prognóstico e aconselhamento genético futuro. Este trabalho resultará em uma tese de mestrado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de respostas de pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências apontadas no parecer inicial:

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO
PAULO UNIFESP-HSP



Continuação do Parecer: 1.576.108

1-Foi informado que será enviado o DNA para a companhia EdgeBio (Gaithersburg, MD, USA).Será enviado material biológico para o exterior? Se sim, será necessário classificar este projeto como sendo da Área Temática Especial e o projeto deverá ser encaminhado à CONEP para análise.

2- Quais familiares irão participar do estudo, uma vez que informa que haverá participação de 4 voluntários?

3- Em relação ao TCLE: O TCLE que foi enviado, indica o nome de Pedro Henrique e Maria do Socorro: quem são estes? Os pais? Entretanto logo em seguida é informada a idade de 9 anos, o que deixa em dúvida a que se dirige o TCLE (pais ou a criança?). E pelo texto inicial do TCLE, o documento parece estar dirigido ao familiar que também participará doando sangue. Favor deixar claro a quem está direcionado o TCLE. Pelo texto do TCLE, este documento pode ser dirigido ao familiar que também for participar doando sangue. Desta forma deve ser retirado da parte inicial, o nome do casal e a idade da criança. Além disto: a)-- todas as folhas devem ser numeradas, iniciando com o número 1 (ex: 1/4,2/4, etc.) ; no TCLE enviado a paginação começa em 13;

b)- a frase que informa sobre o dano pessoal (?Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos de punção do braço neste estudo (nexo causal comprovado), o voluntário tem direito?), não está adequada: a responsabilidade pela prestação de cuidados integrais de saúde pelo tempo que for necessário para o tratamento por danos não pode estar vinculada à comprovação de relação direta e imediata com a participação no estudo, devido à própria dificuldade prática em comprovar esse vínculo de imediato. Assim sendo, danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, sofridos no decorrer da participação no estudo, devem ser acompanhados e tratados pelo pesquisador e seu patrocinador mesmo que ainda não seja estabelecido nexo causal. Solicita-se adequação ? ou seja, retirar o termo "nexo casual".;

c) no campo das assinaturas, deve haver o campo para as assinaturas.

4- Neste estudo, devem ser elaborados 3 tipos de Termos: um, para ser aplicado a cada familiar que for participar do estudo doando sangue; um segundo TCLE pedindo autorização para os pais/responsável da criança a ser estudada; e um termo de assentimento, a ser aplicado à criança. Se considerarmos que o TCLE que foi enviado pode ser aplicado ao familiar participante (com as adequações sugeridas), está faltando, portanto, o TCLE aos pais/responsáveis, e o Termo de

93

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO
PAULO UNIFESP-HSP



Continuação do Parecer: 1.576.108

Assentimento (TALE): - o TCLE aos pais/responsáveis deve ser iniciado com uma frase solicitando autorização aos pais para a participação do filho. Todo o resto do texto deve ser adaptado para este tipo de solicitação e pode ser semelhante ao TCLE que foi enviado (adequando conforma a pendência 3, acima).

- o Termo de Assentimento a ser aplicado à criança: este TALE pode ser bem simples: só é necessário explicar o objetivo da pesquisa, os procedimentos pelos quais a criança irá passar (este ponto deve estar bem explicado), informar que os pais estão de acordo, informar que ela não é obrigada a participar e que pode desistir a qualquer momento sem que haja problema, e que se ela tiver qualquer dúvida, é só perguntar.

5- Este é um estudo de caso. Esta pesquisa, com o estudo de apenas um caso, permitirá responder os objetivos propostos?

resposta: o pesquisador fez as adequações solicitadas. Esclarece que todas as análises serão realizadas no Brasil. Demais questões consideradas respondidas. Pendencia atendida

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_PROJETO_638036.pdf	12/05/2016 10:15:17		Aceito
Outros	Carta_Resposta.docx	09/05/2016 21:44:32	Vanessa Radonsky	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento.pdf	09/05/2016 21:44:08	Vanessa Radonsky	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PAIS_RESPONSÁVEIS.pdf	09/05/2016 21:43:51	Vanessa Radonsky	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_familiar_participante.pdf	09/05/2016 21:43:30	Vanessa Radonsky	Aceito

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO
PAULO UNIFESP-HSP



Continuação do Parecer: 1.576.108

Outros	CoEP.pdf	09/03/2016 22:29:40	Vanessa Radonsky	Aceito
Outros	Cadastro.pdf	09/03/2016 22:28:06	Vanessa Radonsky	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/03/2016 22:25:33	Vanessa Radonsky	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/03/2016 21:55:29	Vanessa Radonsky	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_canalopatia_endocrina.pdf	02/12/2015 23:43:24	Vanessa Radonsky	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Junho de 2016

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Resumo para o público leigo

Este trabalho descreve os desafios do diagnóstico genético de um menino de 6 anos de idade, encaminhado para o ambulatório de endocrinologia por quadro de elevação do hormônio paratormônio (PTH) no sangue associado a presença de depósito de cristais no tecido renal (nefrocalcinose). Ele apresentava história de infecções urinária de repetição e os exames laboratoriais séricos demonstraram concentrações de cálcio e fósforo normais, PTH elevado e magnésio discretamente reduzido, além de um aumento do cálcio urinário. A tomografia de abdome evidenciou a presença de Nefrocalcinose. A associação do PTH elevado com a nefrocalcinose, nos faz pensar em uma lista de doenças para o diagnóstico diferencial. Na medicina tradicional, para afastar ou confirmar cada uma destas doenças, o paciente seria submetido à diversos exames de sangue, urina e de imagem, o que torna todo o processo mais longo, trabalhoso e dispendioso para a família. Sabendo que cada uma destas doenças é causada por alterações em genes específicos, optamos pela utilização de técnicas de biologia molecular. Com o objetivo de otimizar o diagnóstico etiológico considerando vários genes candidatos, optou-se pelo uso da técnica de sequenciamento completo de exoma (WES), que identificou diversas alterações. A principal hipótese diagnóstica seria uma mutação no gene *CLDN16*, responsável pela doença Hipomagnesemia Familiar com Hipercalcúria e Nefrocalcinose (FHHNC), uma doença em que o paciente perde cálcio e magnésio na urina ocasionando todo depósito de cristais de cálcio no rim e que costuma evoluir com comprometimento da função renal. Esta doença inicialmente não foi identificada pelo WES. Optamos por investigar esta doença através de outros métodos biologia molecular (PCR e MLPA) e foi detectado a perda de grande parte do gene *CLDN16*. Neste trabalho será apresentada uma revisão de literatura sobre o tema, além de descrever com mais detalhes a FHHNC. A FHHNC é provocada pela mutação dos genes que codificam as proteínas Claudina 16 ou Claudina 19. A ausência destas moléculas

desencadeia a perda de cálcio e magnésio na urina. O depósito dos cristais de cálcio na urina prejudicam o funcionamento renal, que progride para insuficiência renal crônica. Recentemente, foi descrita a presença de *Amelogenesis imperfecta*, que é um comprometimento do esmalte do dente, associada a síndrome, e que também observada neste paciente. A técnica WES ofereceu grandes avanços no diagnóstico de doenças genéticas, mas ainda apresenta limitações e armadilhas. Este trabalho propiciou um grande aprendizado e acúmulo de conhecimento sobre a interpretação das metodologias de biologia molecular no diagnóstico de doenças endócrinas.