

SHÉLIDA VASCONCELOS BRAZ

**A Importância da Fenotipagem
Aprofundada no Diagnóstico de
Síndromes Genéticas**

BRASÍLIA, 2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

A Importância da Fenotipagem Aprofundada no Diagnóstico de Síndromes Genéticas

Tese de doutorado submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
como requisito à obtenção do título de
Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Acevedo Poppe

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª Juliana Forte Mazzeu de Araújo

BRASÍLIA, 2022

*Dedico esta tese a Dra. Iris Ferrari (in memoriam),
pelo exemplo e inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Meu doutoramento contou com a contribuição e envolvimento de muitas pessoas e instituições culminando com a defesa desta tese. Por isso, meus agradecimentos especiais:

Às minhas orientadoras: Prof. Dra. Ana Carolina Acevedo e Prof. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araujo, pelo aceite em me orientar nesse período. Pela oportunidade que me deram, os conselhos, todo o aprendizado e até os “puxões de orelha” que, por fim, só me fizeram crescer e me tornar uma profissional melhor. Agradeço também pela amizade fora da Universidade, pelos bons momentos vividos que ultrapassam o “só fazer ciência”. Saibam que tenho orgulho de ter sido aluna de vocês.

Agradeço a Dra. Iris Ferrari (*in memoriam*) por todos os ensinamentos, pelo convívio a cada manhã no laboratório, por ter despertado em mim o interesse e a paixão em estudar genética. À Dra. Mara Santos Cordoba, que foi e está sendo uma verdadeira tutora para mim. Agradeço a paciência, por sempre se mostrar disponível a todos os meus questionamentos e principalmente, por mostrar a arte em se fazer citogenética com tanto carinho e profissionalismo. À Profa. Sônia Nair Bão por iniciar a minha carreira científica, pelos anos de convivência e ensinamentos.

Aos amigos e colegas que encontrei durante esse percurso. Meus sinceros agradecimentos pelos momentos tão importantes com vocês: Aluísio Brasil, Andrea Gama, Andreia Maria, Bárbara Merfort, Bruna Amorin, Claudio Rezende, Erica Caldas, Fernanda Guedes, Guilherme Tonelli, Lídia Rosa, Nilza de Jesus, Patrícia Moretti, Rosenelle Araujo, Yago Marques e Silvia Elias, que diretamente fizeram parte dessa etapa da minha vida. Com vocês foi mais fácil e divertido fazer este trabalho!

À minha família, pelo apoio, companheirismo e carinho sempre expressado em todos os momentos da minha vida. Ao meu marido Bruno Dallago, pelo incentivo, respeito às minhas necessidades e total apoio ao meu crescimento profissional. Obrigada por você ser meu parceiro para a vida toda. Aos meus filhos lindos, Enrico e Lorena: Sei que hoje vocês dois não tem noção do feito da mamãe, mas que este texto eternize e testemunhe o quanto vocês dois estiveram presentes, mesmo que nem sempre ajudando diretamente nesta tarefa. Agradeço por serem compreensivos e por terem deixado a mamãe terminar o dever!

Aos queridos pacientes e seus familiares que fizeram parte deste projeto. Saibam que a gratidão será meu sentimento eterno a vocês.

AGRADECIMENTO INSTITUCIONAL

Agradeço à (ao):

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Comitê Francês de Avaliação da Cooperação Universitária com o Brasil (CAPES-COFECUB) pelo financiamento do projeto CAPES-COFECUB 918/18;
- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade de Brasília pelos recursos financeiros;
- Serviço *IMAGINE Institute, Hôpital Necker Enfants Malade* em Paris, França, na pessoa da Dra. Valerie Cormier-Daire pela avaliação do paciente portador de displasia esquelética.
- Laboratório de Microscopia e Microanálise, IB, UnB;
- Laboratório de Farmacologia Molecular, FS, UnB;
- Laboratório de Histopatologia Bucal, FS, UnB;
- Laboratório de Genética Clínica, FM, UnB.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. ASPECTOS ÉTICOS	29
3.1. Autorização CEP	29
3.2. Participantes do estudo	29

CAPÍTULO 1

Deficiência de Cobalamina F em uma paciente com hiperpigmentação cutânea
acentuada e portadora de uma variante em homozigose no *LMBRD1*

1. INTRODUÇÃO	32
2. MÉTODOS	36
2.1. Participante do estudo.....	36
2.2. Processamento ultraestrutural da biópsia de pele	36
2.3. Sequenciamento de nova geração (análise do exoma).....	37
2.4. Extração do DNA	37
2.5. Análise do exoma	38
3. RESULTADOS	39
3.1. Relato de caso	39
3.2. Exame físico	39
3.3. Resultados da análise ultraestrutural	41
3.4. Resultados da análise do sequenciamento de nova geração (exoma).....	42
4. DISCUSSÃO	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

CAPÍTULO 2

Variante patogênica no gene *ENPP5* em paciente com displasia esquelética e anomalias dentárias

1. INTRODUÇÃO	53
2. MÉTODOS	56
2.1. Participante do estudo	56
2.2. Processamento para avaliação morfológica de células e tecidos	56
2.3. Processamento para avaliação celular	57
2.3.1. Estabelecimento de cultura primária	57
2.3.2. Morfometria dos núcleos (imunofluorescência com DAPI)	57
2.3.3. Avaliação da atividade mitocondrial (MTT)	58
2.4. Análise estatística	58
2.5. Processamento para avaliação histopatológica	59
2.6. Colorações especiais	59
2.6.1. Tricrômico de Masson	59
2.6.2. Coloração de Verhoeff	60
2.7. Processamento para imunohistoquímica	60
2.8. Processamento para avaliação ultraestrutural	61
2.9. Processamento para análise molecular	62
2.9.1. Extração do DNA	62
2.9.2. Sequenciamento de nova geração – exoma	62
2.9.3. Análise do exoma	62
2.10. Confirmação da mutação avaliada pelo sequenciamento Sanger	63
2.10.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) Sanger confirmatório	63
2.11. Confirmação da variante avaliada pelo sequenciamento Sanger	64
3. RESULTADOS	65

3.1. Relato de Caso	65
3.2. Exame clínico odontológico	67
3.3. Exame clínico radiográfico	68
3.4. Exames clínicos laboratoriais	71
3.5. Resultados da avaliação celular	72
3.5.1. Caracterização das culturas primárias gengivais	72
3.6. Resultados da avaliação da viabilidade celular	75
3.7. Resultado da análise histopatológica	75
3.8. Resultado da avaliação imunohistoquímica.....	76
3.9. Resultado da análise ultraestrutural	77
3.10. Resultados da avaliação molecular.....	80
3.10.1. Análise dos dados de exoma.....	80
3.10.2. Visualização da variante no IGV e confirmação por sequenciamento Sanger	85
4. DISCUSSÃO	87
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
5. CONCLUSÃO	101
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Representação do metabolismo e transporte intracelular da cobalamina. A cobalamina é ligada à proteína transcobalamina e, então, é endocitada pelo receptor de membrana e enviada ao lisossoma. No interior do lisossoma, a cobalamina é liberada da transcobalamina e, em seguida, é transportada para o citoplasma onde ocorre sua redução de cblIII para cblII mediada por enzimas. A partir daí, a cobalamina pode seguir por duas vias: receber a adição de um grupo adenosil por ação mitocondrial e assim participar como coenzima no ciclo de Krebs ou ser metilada no citoplasma onde irá participar do ciclo do folato. Referência: (Sloan et al., 1993). 33
- Figura 2. Fotos da paciente mostrando a dismorfia facial (A), orelhas com baixa implantação (B); presença de manchas hiperocrômicas: axilas (C); dorso (D); Pescoço (E); Mãos (F) e Pé (G). 40
- Figura 3. Análise de biópsia de pele por microscopia eletrônica de transmissão. Observa-se o citoplasma de fibroblastos contendo melanossoma com depósitos irregulares elétrondensos. Abreviaturas: (N) núcleo; (Me) melanossoma; (Cr) cromatina..... 41
- Figura 4. Esquema gráfico exemplificando as variantes patogênicas descritas no gene LMBRD1 que já foram relacionadas com a deficiência da cblF. A variante em negrito foi identificada na paciente deste estudo. 42

CAPÍTULO 2

- Figura 5. Heredograma mostrando a consanguinidade familiar. A seta indica o caso índice. 65
- Figura 6. Caracterização fenotípica do caso índice mostrando as manifestações clínicas e evolução no período de 2013 e 2019. 66
- Figura 7. Fotografias intrabucais do caso clínico. Nota-se pré-maxila proeminente, hiperplasia gengival, protrusão dos incisivos centrais, diastema e palato ogival (A-C). (D) Radiografia panorâmica. Nota-se atraso na erupção dentária de dentes permanentes, retenção de dentes decíduos (D) e hipercementose. (E) Imagem tomográfica evidenciando a hipercementose (*). 67
- Figura 8. (A) Radiografia de crânio demonstrando o espessamento difuso da díploe e protusão da pré-maxila. (B) Imagem tomográfica do complexo maxilomandibular evidenciando a hipercementose. (C) Reconstrução tridimensional do complexo maxilomandibular. Nota-se a protrusão da pré-maxila. 68

Figura 9. Tomografia computadorizada de crânio mostrando o espessamento difuso da cúpula da calota craniana e da base do crânio (A-D). Observa-se o alargamento de todo o rebordo alveolar na maxila com aumento significativo na espessura buco-palatina (D e F)..... 69

Figura 10. Avaliação radiográfica. (A) Crânio com espessamento dos ossos. (B) Região da cintura escapular evidenciando a diminuição da densidade mineral óssea no úmero e clavícula. (C) Úmero com alargamento da metáfise proximal. (D) Perfil da coluna lombar e do terço distal da coluna torácica apresentando redução difusa da densidade mineral óssea e esclerose das superfícies superiores e inferiores dos corpos vertebrais visualizados. (E) Região da cintura pélvica com pelve e fêmures apresentando redução da densidade mineral óssea. Fêmures apresentando alargamento na região metafisária. ... 69

Figura 11. Exame radiográfico mostrando (A) alargamento da região metadiafisária proximal do rádio e ulna com diminuição da densidade óssea. (B) Afilamento da cortical óssea do metacarpo e falanges. (C-D) Alargamento das regiões metadiafisária distal dos fêmures e proximal das tíbias e fibulas. (F) Pé com o primeiro metatarso alargado. As imagens radiográficas dos membros superiores e inferiores relevam redução importante da densidade mineral óssea. 70

Figura 12. Crescimento dos fibroblastos do paciente e indivíduo controle a partir de fragmento de gengiva (técnica explante). (A) Células do indivíduo controle após 2 semanas de cultivo. (B) Células do paciente após 5 semana de crescimento em cultivo. 73

Figura 13. Representação gráfica da comparação morfológica após a medida dos núcleos das células de fibroblastos de indivíduos controle (preto) e do paciente (cinza). As imagens A e B representam avaliação morfológica pela técnica de imunofluorescência. Em (A) cultura de fibroblastos de indivíduos controle e em (B) cultura de fibroblasto do paciente. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS[®] (v9.3, Cary, North Carolina) usando o teste T. 74

Figura 14. Curva de viabilidade celular dos pacientes controle (verde, preto e azul) representando linhagem de células de 3 indivíduos sem síndrome e das células do paciente em vermelho. O gráfico foi construído a partir dos valores de absorbância nos tempos de 1, 3, 7 e 10 dias de crescimento. Não houve diferença significativa para a viabilidade celular entre o grupo dos indivíduos controle e o paciente ($p > 0.05$). 75

Figura 15. Análise histopatológica de tecido gengival. (A-C) tecido corado com H&E mostra epitélio escamoso estratificado com cristas proeminentes e alongadas. Tecido conjuntivo denso formado por longos feixes paralelos de fibras. (D-F) Cortes corados com Tricômoro de Masson corando as fibras colágenas. (G-I) Coloração de Verhoeff evidenciou a presença das densas fibras elásticas, dispostas paralelamente entre si. (J-L) Imunomarcagem com anticorpo para Ki-67, revelando a porção epitelial com proliferação de células e a região reticular da gengiva com fibroblastos e células endoteliais marcadas positivamente pelo anticorpo. Barra 100 μ m. 77

Figura 16. Micrografia ultraestrutural da gengiva. (A) Fibroblasto mostrando núcleo e longos prolongamentos citoplasmáticos em meio a uma matriz colágena. (B-C) Avaliação transversal de fibrilas colágenas associadas às fibras elásticas. (D) Avaliação longitudinal dos feixes densos e paralelos de elastina. Abreviaturas: (N) núcleo; (Col) fibrila colágena; (ME) microfibrila elástica; (E) elastina..... 79

Figura 17. (A) Inspeção visual da variante no IGV. (B) Resultado do sequenciamento pelo método Sanger, confirmando a variante missense (c.173G>T; p.Gly58Val) em homozigose no paciente e identificada a mesma variante em heterozigose nos pais..... 86

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ABCD4 - Cobalamina J
AdoCbl - Adenosilcobalamina
ANK - *Progressive ankylosis protein homolog*
ATP - Adenosina trifosfato
Cbl - Cobalamina
cblF - Cobalamina F
cblJ - Cobalamina J
CMD - Displasia craniometafisária
CMDD - Displasia craniometafisária dominante
CMR - Displasia craniometafisária recessiva
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO - Dimetilsulfóxido
eMERGE - *Electronic Medical Records and Genomics*
ENPP's - Endonucleases pirofosfatase, fosfodiesterase
ENPP1 - Endonucleases pirofosfatase, fosfodiesterase membro 1
ENPP5 - Endonucleases pirofosfatase, fosfodiesterase membro 5
FAM 20C - *Family with sequence similarity 20, member C*
HPO - *Human Phenotype Ontology*
LMBRD1 - *Lysosomal Cobalamin transport escort protein dominio 1*
LSDs - Doenças de acúmulo lisossomal
MeCbl - Metilcobalamina
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NGS - *Next Generation Sequencing*
NPL - *Natural Language Processing*
OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man*
PAS - Ácido periódico de Schiff
PBS - Tampão salina fosfato

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Exames bioquímicos realizados pré e pós o tratamento com a suplementação da vitamina B12.	41
Tabela 2: Estratégias utilizadas para filtragem das variantes encontradas na análise do exoma da paciente. A análise foi realizada pela plataforma Franklin (Genoox).....	42
Tabela 3: Comparação de dados clínicos de relatos de casos descritos na literatura com deficiência de cblF e variantes de LMBRD1 com as manifestações clínicas da paciente.	45

CAPÍTULO 2

Tabela 4. Sequência dos iniciadores para o gene ENPP5, para a amplificação do DNA pela técnica de PCR.....	64
Tabela 5. Resultados de exames bioquímicos laboratoriais avaliados a partir da coleta de sangue periférico do paciente em três diferentes datas.....	71
Tabela 6. Resumo da caracterização clínica do paciente índice.....	72
Tabela 7: Parâmetros avaliados pelas imagens de microscopia de imunofluorescência dos indivíduos do grupo controle e do paciente.....	74
Tabela 8. Esquema de filtragem dos dados de variantes nas três formas de herança.....	81
Tabela 9. Genes resultantes da filtragem das variantes em homozigose segundo padrão de herança autossômica recessiva com o resumo das suas respectivas funções.	82
Tabela 10. Genes resultantes da filtragem das variantes segundo padrão de herança autossômica dominante, com o resumo das suas respectivas funções.	83
Tabela 11. Genes resultantes da filtragem das variantes em hemizigose, segundo padrão de herança ligada ao cromossomo X, com resumo de suas respectivas funções.....	85

RESUMO

A descoberta do genoma humano e os avanços tecnológicos no sequenciamento genômico foram o marco inicial para que se estabelecesse a prática de “*deep phenotyping*”. Na prática clínica “*deep phenotyping*” é avaliada a partir de dados descritos em prontuário, exames complementares, avaliações morfofoculares e quaisquer outras análises que possam auxiliar na definição de uma hipótese diagnóstica. Utilizando essa metodologia de “*deep phenotyping*” foram abordados dois pacientes que não tinham diagnóstico definido. Neste trabalho foi relatado o caso clínico de uma paciente do sexo feminino com hiperpigmentação disseminada na pele, baixa estatura, dismorfia facial, ulcerações em boca e ânus, voz rouca e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, que teve como diagnóstico a deficiência congênita da vitamina B12. O sequenciamento do exoma revelou uma variante c.515_516del (p.Thr172fs*10) em homozigose no gene *LMBRD1*. A biópsia de pele mostrou inúmeros melanossomos em vacúolos autofágicos em derme papilar. A hipótese que explica a hiperpigmentação cutânea é a incontinência pigmentar da melanina resultado do aumento do estresse oxidativo em virtude da hiperprodução da homocisteína e o desbalanço da glutatona. A deficiência da vitamina B12 deve ser considerada para aqueles pacientes que apresentam hiperpigmentação cutânea com ou sem baixa estatura e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. O tratamento se dá pela suplementação da vitamina B12. Este trabalho também descreveu um paciente portador de uma variante patogênica no *ENPP5* com comprometimento esquelético e anomalias dentárias. O paciente do sexo masculino apresenta alterações morfológicas e cognitivas, crises convulsivas, macrocefalia, crescimento anormal do complexo maxilomandibular, hiperplasia gengival e hipercementose em todos os dentes. Nos exames radiográficos foi evidenciado hiperostose da calota craniana, osteopenia em membros superiores e inferiores e em corpos vertebrais, cifoescoliose, alargamento da região metafisária distal e afilamento da cortical óssea dos ossos longos, crescimento aumentado da pré-maxila e hipercementose nos molares inferiores. O sequenciamento do exoma concluiu tratar-se de uma variante patogênica *missense* (c.173G>T; p.Gly58Val) em homozigose no gene *ENPP5*. Esse paciente é o primeiro relato na literatura que descreve essa variante como causa de uma displasia esquelética. Pouco se sabe sobre a função do *ENPP5* e sua influência no processo de biomineralização e nas anomalias dentárias, necessitando de estudos futuros para melhor compreender a patogênese desta nova displasia esquelética. Portanto, este trabalho ressalta a importância da fenotipagem aprofundada em dois pacientes. Com esta estratégia foi possível orientar a análise molecular e concluir o diagnóstico deles e, assim, permitir o tratamento e a conduta terapêutica específica para esses dois pacientes.

Palavras-chave: Cobalamina F; hiperpigmentação cutânea, *LMBRD1*; *ENPP5*; displasia esquelética, anomalias dentárias

ABSTRACT

The discovery of the human genome and technological advances in genomic sequencing were the starting point for establishing the practice of “deep phenotyping”. In clinical practice deep phenotyping is based on data described in medical records, complementary exams, morphocellular assessments and any other analysis that may help to define a diagnostic hypothesis. Using this strategy we studied two patients who had no defined diagnosis. In this work we report the clinical case of a female patient with widespread hyperpigmentation in the skin, short stature, facial dysmorphism, ulcerations in the mouth and anus, hoarse voice and delay in neuropsychomotor development, whose diagnosis was congenital vitamin B12 deficiency. Exome sequencing revealed a homozygous c.515_516del variant (p.Thr172fs*10) in the *LMBRD1* gene. Skin biopsy showed numerous melanosomes in autophagic vacuoles in papillary dermis. The hypothesis that explains cutaneous hyperpigmentation is the pigmentary incontinence of melanin resulting from the increase in oxidative stress due to the hyperproduction of homocysteine and the imbalance of glutathione. Vitamin B12 deficiency should be considered for those patients who present with cutaneous hyperpigmentation with or without short stature and delayed neuropsychomotor development. Treatment is with vitamin B12 supplementation. This work also described a patient carrying a pathogenic variant in *ENPP5* with skeletal involvement and dental anomalies. The male patient presents morphological and cognitive alterations, seizures, macrocephaly, abnormal growth of the maxillomandibular complex, gingival hyperplasia and hypercementosis in all teeth. The radiographic exams showed hyperostosis of the skullcap, osteopenia in the upper and lower limbs and vertebral bodies, kyphoscoliosis, enlargement of the distal metaphyseal region and thinning of the cortical bone of the long bones, increased growth of the premaxilla and hypercementosis in the lower molars. The exome sequencing revealed a missense pathogenic variant (c.173G>T; p.Gly58Val) in homozygosis in the *ENPP5* gene. This patient is the first report in the literature that describes this variant as the cause of skeletal dysplasia. Little is known about the role of *ENPP5* and its influence on the biomineralization process and on dental anomalies, requiring further studies to better understand the pathogenesis of this new skeletal dysplasia. Therefore, this work highlights the importance of in-depth phenotyping in two patients. With this strategy, it was possible to guide the molecular analysis and conclude their diagnosis and, thus, allow the treatment and specific therapeutic conduct for these two patients.

Keywords: Cobalamin F; skin hyperpigmentation, *LMBRD1*; *ENPP5*; skeletal dysplasia, dental anomalies

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A capacidade de elucidar os mecanismos relacionados à saúde e doença em humanos foi consideravelmente aprimorada na última década. Cada vez mais é aceita a ideia de que a saúde e a doença são determinadas por um conjunto de diversos fatores. Assim, as bases moleculares, os mecanismos metabólicos, os fatores ambientais e até o estilo de vida estão envolvidos como determinantes dos processos saúde/doença (Wright & Herzberg, 2021). Acompanhando esse movimento, as estratégias de diagnóstico também evoluíram, em grande parte como resultado do aprofundamento do conhecimento do código genético humano, etapa fundamental para a definição e delineamento da etiologia de diversas doenças e compreensão das relações entre genótipo e fenótipo. (Cathryn m. Delude 2015).

O projeto “Genoma Humano”, concluído em 2003, possibilitou desvendar mais de 20 mil genes, a um custo altíssimo, na casa dos bilhões de dólares (<https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/>). Isso, por sua vez, gerou otimismo e grande expectativa no meio científico, impulsionando o aprimoramento das tecnologias envolvidas no processo de sequenciamento para torná-lo mais acessível e amplamente utilizado. Os esforços interdisciplinares empenhados pelo projeto “Genoma Humano” abriram um novo campo de aplicação científica, o *Big Science*, a ser empregado na personalização de terapias, na elucidação da fisiopatologia das doenças complexas, no entendimento do genoma do câncer e até mesmo na compreensão de determinados traços comportamentais (Gibbs, 2020).

O surgimento das técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS - *Next Generation Sequencing*) possibilitou a revolução tecnológica na medicina personalizada, com a promessa de promover a um custo mais baixo o sequenciamento automático em larga escala de milhões de sequências de DNA simultaneamente. Assim, passou a ser factível sequenciar um conjunto de genes ou até mesmo todo o genoma de um indivíduo simultaneamente, em tempo relativamente curto e a um custo muito mais baixo do que o custo inicial do sequenciamento do Genoma Humano (Weng, Shah, & Hripesak, 2020). Essa tecnologia despertou o interesse de empresas gerando concorrência de mercado e competição de custos e, assim, o sequenciamento genético, ficou mais acessível (Robinson, 2012; Robinson, Mungall, & Haendel, 2015; Weng et al., 2020)

A ampla utilização do NGS como ferramenta no diagnóstico de doenças aumentou a capacidade de desvendar causas genéticas de diversas doenças. Uma das bases de dados

responsável por reportar as interações de doenças humanas, OMIM- *Online Mendelian Inheritance in Man*, registrava, em 2014, 7.894 fenótipos com bases moleculares conhecidas (Amberger et al., 2015). Em dezembro de 2021, esse número subiu para 9.541 fenótipos com etiologia definida (www.omim.org), um acréscimo de 20,8% em um curto período. Nesse contexto, o NGS assume o papel de uma ferramenta que permite identificar as bases moleculares de doenças que até então não tinham sua etiologia definida. Sem dúvida, o NGS foi um grande avanço para a ciência.

Com a queda do custo do sequenciamento genômico, a realização de exames de NGS foi facilitada. No entanto, apesar de muitos desses dados terem sido processados, boa parte ainda não foi interpretada. Assim, em 2012, cerca de 95% do que foi sequenciado, efetivamente foi interpretado. Já em 2020, apenas 5% daquilo que foi sequenciado foi efetivamente interpretado. Ou seja, atualmente há disponível um volume enorme de dados gerados pelo sequenciamento, mas que, no entanto, não são efetivamente utilizados (genome.gov/sequencingcosts). Em meio a tantos dados obtidos pelo sequenciamento, há necessidade de incluir estratégias de filtragem de informações de fenotipagem como pontos-chave para se estabelecer um diagnóstico. Diante deste cenário é necessário encontrar maneiras que busquem organizar de forma sistemática a quantidade de informações produzidas pelo sequenciamento genômico, a fim de possibilitar a sua utilização em favor da medicina diagnóstica (Magrinelli, Balint, & Bhatia, 2021).

Portanto, nem sempre o uso do NGS permite que a condição do paciente seja facilmente diagnosticados. Para alcançar o diagnóstico é necessário conciliar a informação gerada pelo NGS à prática clínica. Assim, mesmo tendo disponível a informação gerada pelo NGS, a interpretação dessa análise é limitada por diversos fatores tais como a ausência da descrição da causa genética de determinados quadros clínicos, escassez de informações sobre a variabilidade clínica de algumas doenças; o desconhecimento da função de inúmeros genes; a falta de recursos humanos capacitados, cujo principal reflexo é a inacurácia da filtragem de dados; a incapacidade do clínico em correlacionar a clínica do paciente (fenótipo) e a informação genética (genótipo) deste e, sobretudo, a falta de comunicação ou comunicação ruidosa entre os envolvidos no diagnóstico, o que leva a carência de informações e/ou informações imprecisas.

Nesse sentido, a prática de resumir e organizar informações clínicas importantes sobre o paciente, seu histórico familiar e correlacionar essas informações a seus dados fenotípicos, tem auxiliado na construção da hipótese diagnóstica e facilitado a filtragem

das variantes descobertas pela análise de NGS (Magrinelli et al., 2021). Assim, a estratégia de filtragem na análise de dados do sequenciamento se baseia em informações fenotípicas do paciente. Sem esses dados, a probabilidade de se desvendar a causa genética associada àquela patologia torna-se muito baixa. Além disso, é importante destacar que os dados de sequenciamento revelam muitas variantes discordantes do genoma de referência e, em alguns casos, revelam genes ou variantes que nem sequer foram descritas ou que possuem poucas informações disponíveis sobre a sua correlação com alguma condição clínica. Desse modo, para que a avaliação seja consistente, faz-se necessário conhecer amplamente a condição clínica e informações úteis sobre o fenótipo do paciente (Robinson, 2012; Robinson et al., 2015)

Quando consideramos o termo “fenótipo” no contexto biológico, alguns autores o definem como “conjunto de características observáveis de um organismo” (Robinson, 2012). Por outro lado, uma definição de fenótipo mais abrangente descritas por outros autores conceituaram fenótipo como “um conjunto de características de um indivíduo que compreende sua morfologia e fisiologia, envolvendo o nível celular, sistêmico e até o perfil de expressão gênica em resposta aos estímulos ambientais”. No contexto de saúde, o fenótipo dos pacientes é definido a partir do histórico médico e por avaliação dos exames físico, bioquímicos, imaginológicos e psicológicos englobando quaisquer outros fatores que possam ter o objetivo de traçar e definir uma hipótese diagnóstica (Robinson, 2012; Robinson et al., 2015).

Visando melhorar a acurácia diagnóstica, surgiu o termo “*fenotipagem*” sintetizando em uma única palavra “o ato de descrever sistematicamente e de modo padronizado as características de um fenótipo”. Em 2006, foi lançado nos Estados Unidos o programa *Electronic Medical Records and Genomics* (eMERGE) que emvidou esforços significativos à fenotipagem usando registros eletrônicos de saúde para identificar e compilar descritores fenotípicos a fim de criar uma base de dados padronizada cuja finalidade é melhorar o diagnóstico genômico e a descoberta de genes de interesse (Sremba, McCandless, & Baker, 2020).

Uma estratégia que potencializa os resultados da fenotipagem é a associação de ferramentas de inteligência artificial. Quando associadas à fenotipagem, essas ferramentas, chamadas de NLP- *Natural Language Processing*, têm a capacidade de compreender a linguagem humana e extrair de textos médicos e prontuários as palavras e expressões importantes para a avaliação do paciente (Weng, Shah, e Hripcsak 2020). Como exemplo, Liu et al. (Liu et al., 2019) utilizaram o NLP para averiguar prontuários

médicos e identificar terminologias e sintomas clínicos que contextualizassem doenças psiquiátricas e correlacionaram esses termos aos possíveis genes candidatos pela análise de NGS. Da coorte analisada, usando a ferramenta NPL, foi possível determinar a causa genética e diagnosticar esses pacientes mais facilmente do que apenas com as avaliações tradicionais (Liu et al., 2019).

Contudo, a evolução da capacidade diagnóstica foi além. Com os avanços das descobertas genômicas e com a riqueza de informações disponíveis, surgiu a prática do “*Deep phenotyping*” ou o “fenotipagem aprofunda” que pode ser entendida como a análise precisa e abrangente de características observáveis de alterações fenotípicas advindas da interação entre genética, epigenética e estilo de vida. Ainda, de acordo com Wright and Herzber (2021), “*deep phenotyping*” é uma nova abordagem médica que muda o foco da simples identificação da doença para uma caracterização detalhada das anormalidades apresentadas pelo paciente (Wright & Herzberg, 2021).

O conhecimento sobre o espectro de anormalidade do fenótipo do paciente contribui para prevenir complicações ou pelo menos reconhecê-las em estágios suficientemente precoces para que os tratamentos propostos sejam eficazes e acessíveis (Robinson et al., 2015; Son et al., 2018). No entanto, combinar a descrição fenotípica aos dados genômicos ainda é uma prática falha. As descrições fenotípicas de doenças são imprecisas, resumidas e muitas vezes inespecíficas. Superar essa dificuldade requer um exame físico minucioso e multidisciplinar que vai além daquilo que normalmente é registrado em um prontuário médico (Sremba et al., 2020; Weng et al., 2020).

Não obstante, identificar genes causais que melhor expliquem um conjunto de fenótipos clínicos é uma tarefa desafiadora (Sremba et al., 2020; Weng et al., 2020). Por essa razão, ferramentas computacionais de priorização de genes baseadas em fenótipo têm tornado a correlação fenótipo-genótipo mais fácil. O objetivo dessas plataformas é a geração de uma lista priorizada de genes candidatos (o genótipo) em resposta à inserção de sinais e sintomas clínicos de um indivíduo (o fenótipo). Esse processo tem auxiliado nos algoritmos de análise do NGS e melhorado a interpretação nos diagnósticos sobre as análises de variantes (Wright & Herzberg, 2021). Dentre os bancos de dados disponíveis, destaque deve ser dado ao HPO (*Human Phenotype Ontology*), uma plataforma que agrupa descrições de vários bancos de dados relacionando a fenotipagem ao gene e às suas variantes, comparando o perfil de entrada ao perfil de outros pacientes que possuem condições clínicas semelhantes (<https://hpo.jax.org/app/>). Existem também outras plataformas disponíveis tais como: Phevor, Phen-Gen, eXtasy, PhenIX, Exomiser,

Phenomizer e Phenolyzer. Dessa forma, o uso de plataformas digitais otimiza a análise encurtando o tempo para o diagnóstico e a tomada de decisão quanto à conduta terapêutica (Son et al., 2018; Sremba et al., 2020).

Son et al. (2018) validaram 4 tipos diferentes de plataforma de análise e padronização de fenótipo usando a estratégia de fenotipagem aprofundada em 28 pacientes pediátricos. As ferramentas usadas nesses estudos foram: Expert; MedLEE; MetaMAP e Phenomizer MetaMAP. Esses pacientes já possuíam o diagnóstico confirmado de doenças monogênicas, porém o objetivo do trabalho foi de validar a utilização em associação dessas ferramentas com a combinação de dados de exames de sequenciamento genômico. Os resultados dos testes facilitaram a análise da descoberta das variantes causativas das doenças, reduzindo substancialmente o número de genes candidatos e assim, possibilitaram o diagnóstico genômico dos 28 pacientes. Além desse grupo de estudo, os pesquisadores aplicaram a mesma metodologia em outros pacientes com diferentes doenças crônicas e também obtiveram sucesso. Por fim, os autores reiteraram que o uso de informações de “*deep phenotyping*” ajudou na descoberta de genes com variantes causais, enriquecendo a compreensão da patogênese das doenças e aumentando a eficiência do diagnóstico.

A prática da utilização da fenotipagem aprofundada ultrapassa a análise das anormalidades observáveis de um paciente e cria atalhos para a execução de uma medicina personalizada, com o poder de oferecer o melhor cuidado terapêutico disponível àquele indivíduo. Quando se aplica a fenotipagem aprofundada, a análise do paciente vai além das estratégias de pesquisa clínica tradicionais, voltando-se a avaliação aprofundada na busca de respostas àquela condição. Como exemplo, o estudo realizado por Divaris et al. (2019) que traçaram o perfil metabólico da microbiota oral de uma população, associando este a padrões clínicos de pacientes pediátricos com o intuito de inferir a predisposição a subtipos de cárie. Esse estudo translacional agregou informações sobre a fisiopatologia da cárie e permitiu associar a fenotipagem à prevenção da doença, uma vez que a família e paciente possuíam dados para que se iniciassem procedimentos de forma antecipada de modo a evitar o início da destruição das estruturas dentárias (Divaris, 2019).

Contudo, em algumas condições, há necessidade de ainda mais informações para compreender a fisiopatologia da doença. Nesses casos, associado às informações fornecidas pelos modernos métodos de avaliação genômica, faz-se necessária a caracterização de células e tecidos como fator importante para desvendar o diagnóstico do paciente.

A caracterização celular tomou corpo nos anos 70 e 80, quando a biologia molecular estava em seu estágio inicial. A ultraestrutura de células e as descobertas de achados patognomônicos abriram caminhos para a descrição de novas doenças. As doenças de acúmulo, a avaliação de tumores sólidos e doenças dermatológicas são algumas das áreas da medicina que graças ao conhecimento da arquitetura celular e do padrão dos tecidos podem ser classificadas e caracterizadas a partir da análise celular (Fassihi et al. 2016; Ferns and Halpern 2018; Papa et al. 2010). Por essa razão, o uso da caracterização celular tem sido um aliado adicional a compor o rol de ferramentas da fenotipagem aprofundada.

Assim, o estudo desenvolvido por Lyudovyyk et al. (2019) combinaram as informações de laudos histopatológicos aos fenótipos de cada paciente para definir as vias metabólicas envolvidas no processo patológico e, assim, classificar alguns tipos de câncer. Nesse estudo, os autores comprovaram a importância de unir os dados de descrição patológica aos achados genômicos para a melhor classificação da doença e, por conseguinte, permitir a melhor estratégia terapêutica individualizada para cada um dos pacientes (Papa et al., 2010). Ainda, o trabalho de Calame et al. (2021) reforça a importância da utilização do “*deep phenotyping*” no diagnóstico de Distrofia muscular, uma vez que a interpretação isolada dos dados de NGS nesse caso levou a um diagnóstico falso-negativo. Somente após a utilização do “*deep phenotyping*” foi possível identificar uma variante intrônica no sítio de *splicing* do gene da emarina, ou seja, somente após a conciliação dos dados fenotípicos, análises histopatológicas e análise funcional é que foram identificados pontos críticos (ausência de proteína emarina no músculo e características clínicas) consistentes com o diagnóstico de Distrofia Muscular do tipo Emery-Dreifuss (Calame et al., 2021).

O “*deep phenotyping*” também é um aliado no que tange as doenças de acúmulo. Doenças de acúmulo lisossomal (LSDs), formam um grupo de doenças raras que compõe mais de 50 condições já descritas que apresentam como causa uma variante genética que, por sua vez, leva a uma deficiência enzimática e resulta em acúmulo de macromoléculas específicas, alterando a função lisossômica (Ferns & Halpern, 2018; Komlosi, Solyom, & Beck, 2016).

Existem distintos fenótipos relatados para esse grupo de doenças. Nesses casos, muitas são as características celulares que se diferenciam em padrão de estocagem, conteúdo de acúmulo celular e aparência ultraestrutural. No entanto, alguns deles se sobrepõem, o que dificulta o diagnóstico clínico. Como estratégia tradicional para a

classificação e definição das LSDs, são utilizados o perfil bioquímico e a dosagem de enzimas séricas. Por exemplo, teste de rastreio de glicosaminoglicanas e oligossacarídeo em pacientes suspeitos de mucopolissacaridoses. Em adição, a análise de biópsia e a avaliação ultraestrutural do tecido de pacientes com suspeita clínica de doenças metabólicas podem revelar alterações específicas ou sugerir um diagnóstico diferencial a partir da análise do tecido biopsiado. Para cada um dos mais de 50 tipos de doenças de depósito há características ultraestruturais específicas com inclusões celulares observadas à microscopia eletrônica e que um técnico bem treinado é capaz de distinguir e classificar subsidiando a prática do “*deep phenotyping*” (Ferns & Halpern, 2018; Komlosi et al., 2016; Papa et al., 2010).

Um exemplo de doença de estocagem é a doença de Pompe. Um tipo de glicogenose do tipo II com manifestações graves pelo acúmulo de glicogênio em coração, fígado, rim, glândulas endócrinas, músculos, cérebro e medula espinhal. O defeito acontece pela ausência de atuação da enzima alfa 1,4 glucosidase (maltase ácida), uma hidrolase responsável pela degradação do glicogênio lisossomal (OMIM # 232300) (Weng et al., 2020; Zhang et al., 2016). A análise ultraestrutural de fragmentos de biópsia muscular típicas da Doença de Pompe são caracterizadas pela formação de vacúolos autofágicos originados pela degradação de lisossomas contendo material heterogêneo, membranoso e elétron-denso com aspecto mieloide em fibras musculares do tipo 1. Nas fibras do tipo 2, os lisossomos estão dispostos de forma aleatória com a presença de grandes vacúolos autofágicos (Werneck, Lorenzoni, Kay, & Scola, 2013).

Lim et al. (2014) fizeram um apanhado de informações obtidas sobre a doença de Pompe: desde a caracterização clínica do paciente, passando pela análise genômica, caracterização celular e do perfil bioquímico enzimático, até o desenho experimental com modelo animal para discutir a fisiopatologia da doença e criar terapias genéticas alvo. Os autores utilizaram-se do conceito de “*deep phenotyping*” para melhor compreender e tratar pacientes portadores da Doença de Pompe.

Quando se realiza o “*deep phenotyping*”, avaliações multissistêmicas são necessárias. Nesse escopo, as alterações orais podem fazer parte de manifestações específicas de determinadas síndromes. Como exemplo, a síndrome de Raine que está relacionada à variante no gene *FAM20C* responsável pela codificação de uma proteína localizada em diversos tecidos que participam no processo do controle de biomineralização, homeostase lipídica, cicatrização de feridas e adesão celular (Acevedo, Poulter, Alves, Lima, et al., 2015; Raine, Winter, Davey, & Tucker, 1989). O estudo

desenvolvido por Acevedo et al. (2015) avaliou duas famílias brasileiras não relacionadas entre si, com histórico de casamento consanguíneo e que se caracterizavam pela presença de alterações orais dos indivíduos afetados. Além dessas alterações, também apresentaram manifestações sistêmicas no trato respiratório, surdez neurosensorial, calcificações intracranianas, hiploplasia de face e micrognatia. A análise pelo NGS confirmou a presença da variante no gene *FAM20C*, sendo que uma das famílias teve resultado de uma variante *missense* em homozigose (c.1487C>T, p.Pro496Leu) e a outra família apresentou a variante em homozigose em sítio de *splicing* no gene *FAM20C* (c.784+5 G>C, p.Trp202Cys*37) (Acevedo et al. 2015).

Esse estudo relacionado à Síndrome de Raine pode comprovar que a avaliação multiprofissional associada a estratégias diagnósticas não tradicionais forma um conjunto de fatores, um arcabouço de informações importantes, concatenando elementos aparentemente isolados entre si com o objetivo de se estabelecer o diagnóstico e compreender a patogênese da doença executando o “*deep phenotyping*”, para cada vez mais, desenvolver uma medicina personalizada e de alta eficiência.

Portanto é incontestável que as descobertas sobre o genoma humano e sua aplicação na área médica têm mudado e evoluído para facilitar o diagnóstico e traçar condutas terapêuticas. Hoje, o paciente é avaliado como um ser único que manifesta um fenótipo que, por sua vez, está intimamente relacionado ao genótipo transcrito em suas células. A cadeia de triagem para se chegar a um diagnóstico preciso, confiável e cada vez mais rápido, utiliza ferramentas computacionais, programas e plataformas de NPL, inteligência artificial e várias outras estratégias e ferramentas de fenotipagem aprofundada, associadas à metodologia tradicional, que, uma vez somadas, proporcionam o acúmulo de um grande volume de informações que, analisadas em conjunto, conseguem aplicar uma medicina personalizada.

Sem dúvida, a técnica que alavancou essas mudanças na medicina tem origem no sequenciamento humano e sua posterior evolução para as ferramentas de sequenciamento genômico. Com a união desse grande volume de informações genômicas às coleções de características fenotípicas da prática da fenotipagem aprofundada é possível fornecer dados precisos para estabelecer o diagnóstico e escolher a conduta terapêutica e o melhor manejo clínico (Simpson et al., 2020; Weng et al., 2020; Werneck et al., 2013).

Por compreender que a fenotipagem aprofundada é uma estratégia para promover o diagnóstico e a caracterização de patologias e que permite atuar na medicina de

precisão, este trabalho teve como objetivo utilizar o conceito de fenotipagem aprofundada na caracterização de dois pacientes com doenças genéticas sem diagnóstico definido.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar o fenótipo e identificar a etiologia genética de dois pacientes portadores de síndrome genética, sem diagnóstico definido, que estão em acompanhamento no Hospital Universitário de Brasília – HUB.

2.2. Objetivos Específicos

- a. Descrever as manifestações sistêmicas dos dois pacientes a partir de dados registrados em prontuário e obtidos nos exames complementares.
- b. Analisar as alterações morfológicas e celulares desses pacientes para auxílio na caracterização e ao diagnóstico dos dois pacientes
- c. Identificar variantes causativas das síndromes pelo método de sequenciamento de nova geração (Exoma).

Para apresentação dos resultados esta tese será dividida em dois capítulos em forma de artigos. O Capítulo I refere-se ao primeiro trabalho denominado “*Deficiência de cobalamina F em uma paciente com hiperpigmentação cutânea acentuada e portadora de uma variante em homozigose no LMBRD1*”, o qual foi publicado na revista *Clinical and Experimental Dermatology*, em Dezembro de 2021. O segundo capítulo tem por título “*Variante patogênica no gene ENPP5 em paciente com displasia esquelética e anomalias dentárias*” e será submetido a avaliação por pares com vistas à publicação em revista especializada indexada.

Aspectos éticos

3. ASPECTOS ÉTICOS

3.1. Autorização CEP

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP/FM – UnB). Os participantes foram devidamente informados e esclarecidos sobre os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa e demais aspectos éticos envolvidos. A autorização para participação e uso de material biológico foi concedida mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos participantes maiores de 18 anos e pelos seus responsáveis legais no caso dos menores de 18 anos.

3.2. Participantes do estudo

Capítulo I

A participante do relato de caso deste estudo é do sexo feminino, com hipótese diagnóstica inicial de hiperpigmentação cutânea, baixa estatura e alterações de face com etiologia a esclarecer. Esta paciente foi encaminhada pela equipe da dermatologia do Hospital Universitário de Brasília-HUB para a avaliação e investigação pela equipe de Genética Clínica do Hospital Universitário de Brasília-HUB.

Capítulo II

O caso índice avaliado neste estudo é um paciente de sexo masculino com hipótese diagnóstica inicial de displasia craniometafisária ou displasia metafisária. O paciente foi encaminhado em 2013 pelo Serviço de Genética do Hospital Sarah Kubitschek para a Clínica de Atendimento a Pacientes Portadores de Anomalias Dentárias, na Unidade de Saúde Bucal, para avaliação das malformações craniofaciais.

Capítulo I

*Deficiência de cobalamina F em uma paciente
com hiperpigmentação cutânea acentuada e
portadora de uma variante em homozigose no
LMBRD1*

1. INTRODUÇÃO

A cobalamina (Cbl) ou vitamina B12 faz parte de um grupo de moléculas que possuem como característica química comum a presença de um núcleo corina, com um átomo central de cobalto (Banerjee, Gherasim, & Padovani, 2009). Esse grupo de moléculas atua como coenzima em diferentes processos fisiológicos, a exemplo da síntese de DNA, divisão celular, desenvolvimento embrionário, formação da hemoglobina e do sistema nervoso e no metabolismo energético de insulina (Buers et al., 2016). As cobalaminas são moléculas hidrossolúveis encontradas em praticamente todos os tecidos animais, porém, com maior concentração no fígado. Não são produzidas de forma fisiológica pelo organismo, sendo necessária a suplementação ou consumo de alimentos de origem animal para suprir as exigências nutricionais dessa vitamina.

No plasma, a vitamina B12 é transportada por uma proteína chamada de transcobalamina. A cobalamina, quando reconhecida por proteínas de membrana é endocitada, é levada até a membrana do lisossoma para que ocorra o fluxo de entrada e saída pelas proteínas da membrana lisossomal (Sloan, Carrillo, Adams, & Venditti, 1993). No interior do lisossoma, enzimas lisossômicas desassociam a transcobalamina, que então é exportada para a mitocôndria e citosol, onde ocorrerá a via de biossíntese de coenzimas. A maior parte da cobalamina celular é encontrada nas mitocôndrias na forma de 5'-desoxiadenosilcobalamina. Na mitocôndria, a cobalamina é metabolizada e forma a adenosilcobalamina (AdoCbl) que, por sua vez, participa do ciclo de respiração celular, enquanto, no citoplasma, a cobalamina é metabolizada e forma a metilcobalamina (MeCbl) um importante cofator para a conversão de homocisteína em metionina (Fettelschoss et al., 2017; Rutsch et al., 2009) (Figura 1).

Ao se abordar o transporte da cobalamina intracelular, necessário se faz relatar a ação de duas importantes proteínas, quais sejam, a cobalamina J (cblJ) expressa pelo gene *ABCD4* e a cobalamina F (cblF), expressa pelo gene *LMBRD1* (Banerjee et al., 2009; Buers et al., 2016; Fettelschoss et al., 2017). Ambas atuam como proteínas transmembrana em diferentes organelas como: peroxissomo, retículo endoplasmático e lisossoma (Coelho et al., 2012; Deme et al., 2014; Kawaguchi, Okamoto, Morita, & Imanaka, 2016) com função de transporte dependente de ATP de uma ampla variedade de substratos.

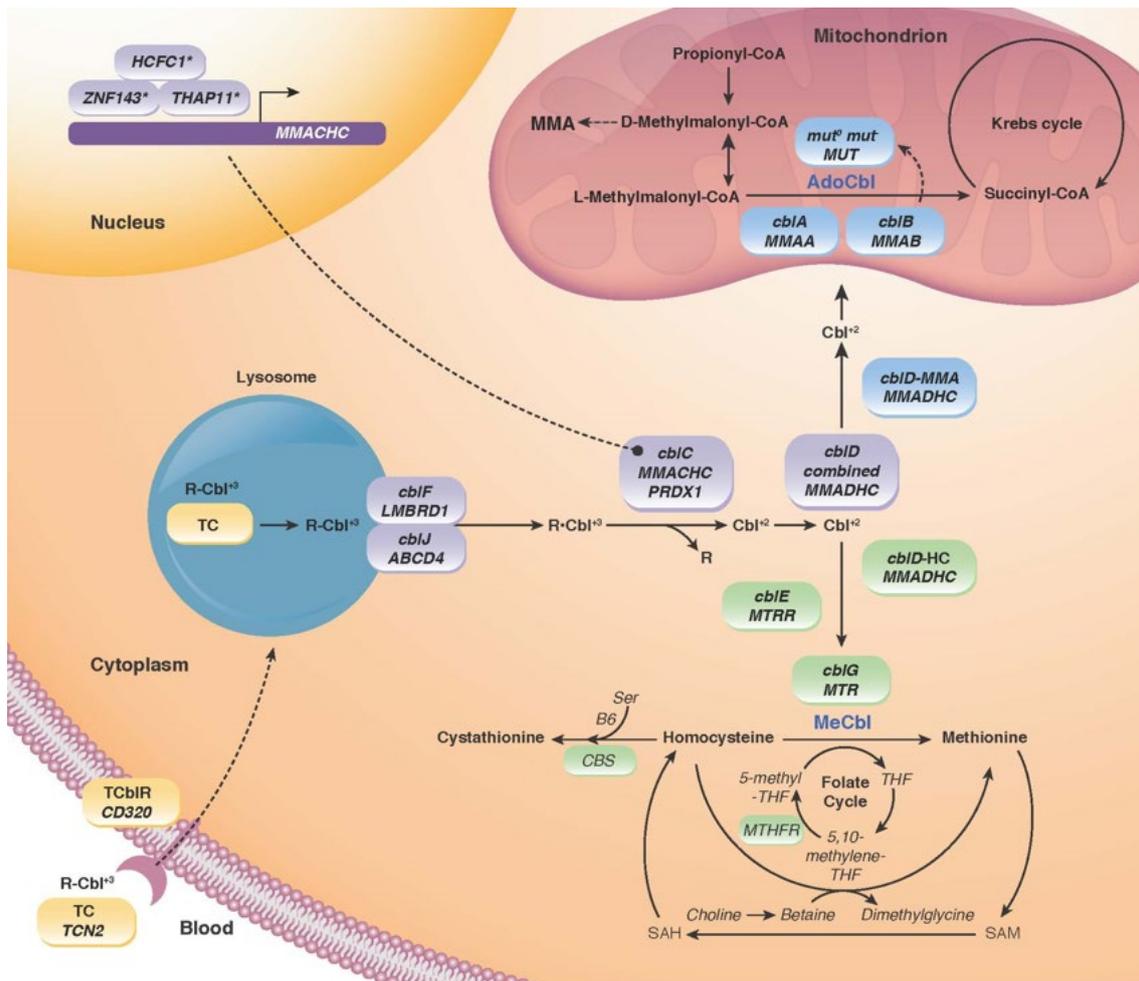


Figura 1. Representação do metabolismo e transporte intracelular da cobalamina. A cobalamina é ligada à proteína transcobalamina e, então, é endocitada pelo receptor de membrana e enviada ao lisossoma. No interior do lisossoma, a cobalamina é liberada da transcobalamina e, em seguida, é transportada para o citoplasma onde ocorre sua redução de Cbl^{III} para Cbl^{II} mediada por enzimas. A partir daí, a cobalamina pode seguir por duas vias: receber a adição de um grupo adenosil por ação mitocondrial e assim participar como coenzima no ciclo de Krebs ou ser metilada no citoplasma onde irá participar do ciclo do folato. Referência: (Sloan et al., 1993).

O complexo formado pelas proteínas cbIj e cbIf atua de forma crítica no transporte da membrana lisossomal. Estudos realizados por Coelho et al. (2012) provaram o envolvimento da cbIj e cbIf no transporte lisossomal, utilizando marcação fluorescente das duas proteínas. O resultado do experimento atestou que o complexo é essencial a exportação Cbl^{III} lisossomal em direção ao citoplasma, provando a forte relação entre cbIj e cbIf nas etapas da metabolização da cobalamina.

O entendimento do metabolismo das cobalaminas e das proteínas envolvidas nesse processo é importante para se compreender a fisiopatologia da deficiência da vitamina B12 no ser humano. A deficiência de vitamina B12 pode ocorrer em função de falhas em qualquer das etapas de metabolização desse nutriente: do aporte nutricional adequado à digestão e absorção ou o transporte intracelular, parâmetros esses que devem ser avaliados para se determinar a causa específica da deficiência dessa vitamina. Por exemplo, ingestão de quantidades aquém das exigências nutricionais ou a carência de alimentos de origem animal, ou ainda má absorção intestinal, acarretam alterações na via metabólica e nas dosagens séricas de vitamina B12 levando à deficiência desse nutriente. Outro fator associado à deficiência de vitamina B12 são os erros inatos do metabolismo (Chiang, Hung, Wang, Lee, & Yang, 2013; Huemer & Baumgartner, 2019).

Os erros inatos do metabolismo são distúrbios genéticos que geralmente estão associados a alterações enzimáticas capazes de interromper vias metabólicas, ocasionando falha de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo. As doenças metabólicas hereditárias resultam na falta ou alteração da produção de uma enzima, que por sua vez, compromete a via metabólica ocasionando acúmulos de substrato da etapa anterior à interrupção ou ao surgimento de uma rota metabólica alternativa (Husny & Fernandes-Caldato, 2006; Takeichi et al., 2015).

Um exemplo de erro inatos de metabolismo é o defeito em alguma das proteínas ou em algum produto na via metabólica das cobalaminas, levando à deficiência de vitamina B12 secundária ou seja, sem relação com carência nutricional ou problemas absorptivos (Huemer & Baumgartner, 2019). Na literatura, foram relatados mais de 10 defeitos distintos associados a proteínas que afetam as vias do metabolismo intracelular de cobalaminas: *cblA*, *cblB*, *cblC*, *cblD*, *cblE*, *cblF*, *cblJ*, *cblG*, *cblX* e *mut* (Banerjee et al., 2009). Os diversos defeitos podem causar hiper-homocisteinemia isolada, acidúria metilmalônica isolada ou ambas (Coelho et al., 2012). Algumas manifestações clínicas já foram associadas a erros na via metabólica, como hiperhomocisteinemia isolada com a presença de variante na *cblD*; homocisteinúria com defeitos nas *cblE* e *cblG*; acidúria metilmalônica com *cbl A, B, C, D e F* (Rutsch et al., 2009).

Os erros inatos do metabolismo das cobalaminas podem se manifestar através de uma variedade de sinais e sintomas clínicos, a depender da alteração da via metabólica que está alterada. Dentre as manifestações clínicas relatadas estão incluídos dismorfias, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, encefalopatia e anemia megaloblástica (Constantinou et al., 2015). Variantes patogênicas bialélicas nos genes *ABCD4* e

LMBRDI podem gerar comprometimento sistêmico logo após o nascimento como: déficit de crescimento pós-natal, dificuldades em se alimentar, malformações cardíacas congênitas, letargia, hipotonia e anemia megaloblástica. Do ponto de vista bioquímico, podem ser identificados aumento nas concentrações séricas de homocisteína e ácido metilmalônico (Constantinou et al., 2015; Fettelschoss et al., 2017; Rutsch, Gailus, Suormala, & Fowler, 2011; Vasiliou, Vasiliou, & Nebert, 2009; Vassiliadis, Rosenblatt, Cooper, & Bergeron, 1991).

Variantes patogênicas no gene *LMBRDI* podem estar associadas a sintomatologia diversa e frequentemente mais grave no paciente como: retardo do crescimento intrauterino, atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, convulsões, glossite, estomatite e infecções recorrentes. Outra característica que já foi relatada em pacientes com variante nos genes *ABCD4* e *LMBRDI* foi a presença de depósitos elétron-densos em lisossomos e mitocôndrias quando avaliada a biópsia de pele em microscopia eletrônica de transmissão (Vassiliadis et al., 1991).

Apesar das cobalaminas serem bem estudadas, poucos são os relatos na literatura que abordam as manifestações e o desfecho clínico referentes à variante patogênica no gene *LMBRDI*, sendo descritos apenas 18 casos. Até o momento, suspeita-se haver uma correlação da gravidade dos sinais e sintomas com o tipo de variante ocorrida no gene. Alguns estudos apontam que pacientes que tiveram alteração do tipo *frameshift* no gene *LMBRDI* apresentaram fenótipo mais grave em comparação aos pacientes com variante do tipo *missense* (Sremba et al., 2020). Por essa razão existe a necessidade de estudar mais pacientes com a deficiência de vitamina B12 secundária a defeitos no metabolismo da cobalamina e identificar sua etiologia específica.

Este estudo teve por objetivo descrever uma paciente com diagnóstico tardio de deficiência da vitamina B12, que apresentou manchas hiperocrômicas na pele, atraso no desenvolvimento intelectual, baixa estatura e dismorfismo facial.

2. MÉTODOS

2.1. Participante do estudo

O caso avaliado neste estudo é uma paciente do sexo feminino com consanguinidade parental, apresentando baixa estatura e manchas difusas hiperocrômicas desde o nascimento com agravamento do quadro clínico com o avanço da idade. A paciente foi inicialmente avaliada pelo serviço de Dermatologia do HUB e encaminhada para a equipe de geneticistas do Hospital Universitário de Brasília-HUB. Após a avaliação clínica da paciente e com o intuito de investigar e definir o diagnóstico, foram coletados fragmentos de pele para avaliação ultraestrutural e extração de DNA para avaliação genética.

2.2. Processamento ultraestrutural da biópsia de pele

Com o objetivo de melhor caracterizar e avaliar as manchas hiperocrômicas, foi feita biópsia axilar de pele para análise ultraestrutural. A avaliação pela microscopia eletrônica de transmissão permite identificar estruturas celulares com maior poder de resolução que a microscopia ótica. Dessa forma, essa avaliação identificou os componentes do tecido epitelial e conjuntivo, observando seus componentes celulares e permitiu avaliar possíveis depósitos em organelas.

Após a coleta, os fragmentos foram imediatamente seccionados em aproximadamente 1 mm³ e colocados em tubos de 1,5 ml do tipo “eppendorf” contendo aproximadamente 1 mL de solução fixadora de Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose, 0,5mM de cloreto de cálcio e 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2), mantidos por doze horas a 4 °C. Posteriormente, foram realizadas lavagens com 0,1M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2). A etapa de pós-fixação foi realizada com a adição de tetróxido de ósmio 1% 1:1 (v/v) à solução de ferricianeto de potássio 0,08% e cloreto de cálcio 5mM, diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por uma hora. As amostras foram mantidas protegidas da luz durante esse processo.

Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 10 min e submetidas à pós fixação “*in block*” com solução aquosa de acetato de uranila 0,5% durante duas horas. Em seguida, o material foi lavado com água destilada.

O processo de desidratação foi iniciado em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% quinze minutos em cada concentração e três banhos de acetona 100%, 10 min cada).

Após a desidratação, as amostras foram infiltradas com mistura crescente de resina Spurr[®] e decrescente de acetona, iniciando a mistura na proporção (acetona:resina) em 2:1, 1:1, 1:2 (v/v) e resina pura. Cada infiltração durou de doze a vinte horas, sendo a última infiltração feita com a resina Spurr[®] pura, durante seis horas. Em seguida, as amostras foram incluídas em fôrmas apropriadas de silicone contendo resina Spurr[®] pura. O material foi mantido em estufa a 57 °C, por aproximadamente setenta e duas horas para polimerização da resina.

O material foi seccionado em ultra-micrótomo Leica EM UC7[®], utilizando-se navalhas de vidro para obtenção de cortes semi-finos (2-5 µm de espessura) e navalha de diamante para cortes ultrafinos (80-100 nm). Os cortes ultrafinos foram coletados em telas de cobre de 300 *mesh* e contrastados com acetato de uranila 3% diluído em água destilada durante 30 min e em solução de citrato de chumbo saturado por 10 min, em seguida lavados em água destilada. O material foi analisado em Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo Jeol[®] 1011C e a captura de imagens feita pela câmera Gatan Digital Micrograph[™] 3.11.0 Copyright[©].

2.3. Sequenciamento de nova geração (análise do exoma)

Como estratégia de busca da variante causativa correspondente às manifestações patológicas da paciente, foi feita a análise do exoma. Esta metodologia, também conhecida como sequenciamento de nova geração (NGS), permite sequenciar toda a porção codificante (éxons) do genoma de um indivíduo. Dessa forma é possível comparar as sequências do indivíduo afetado com bancos de dados e com o genoma de referência. Esse método é constituído de três etapas: 1) preparo da biblioteca onde são selecionadas e amplificadas as regiões codificantes, 2) sequenciamento em alta escala e 3) análise de bioinformática.

2.4. Extração do DNA

O DNA da paciente foi extraído a partir do sangue periférico pelo método *Puregene "Salting out"* (Miller et al., 1988). O DNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) e verificada a pureza através da razão das absorvâncias dos comprimentos de ondas. As bibliotecas de sequenciamento foram

preparadas utilizando-se o kit *SureSelect Human All Exon V6* (*Agilent Technologies*) e sequenciadas pela *Macrogen Inc.* na plataforma *Illumina HiSeq 4000* com cobertura média de 50 vezes e comprimento de leitura de 2 x 100 pb.

2.5. Análise do exoma

A técnica de sequenciamento de nova geração é aplicada para a detecção de alterações em variantes, permitindo a aplicação de filtros de análise que auxiliam na busca por variantes correlacionadas a alteração patológicas já descritas anteriormente. A análise das variantes foi realizada utilizando a plataforma Franklin (www.genoox.com). Durante a análise foi possível importar os dados de sequenciamento para configurar nosso próprio *pipeline*. Uma série de filtros foi aplicada para obter um conjunto de variantes candidatas causadoras de doenças: (1) variantes removidas por erro de leitura ou baixa cobertura; (2) filtragem baseada em efeito deixando restrito o modo: *frameshift*, *missense*, *nonsense* e *splicing*. (3) filtro para zigosidade, deixando homocigoto e heterocigoto (4) filtros de características fenotípicas da paciente foram utilizados. Após a aplicação dos filtros, uma análise das variantes restantes foi realizada individualmente de acordo com o quadro clínico apresentado e a classificação do ACMG.

3. RESULTADOS

3.1. Relato de caso

Paciente do sexo feminino, 13 anos de idade, segunda filha de pais consanguíneos (primos de 3º grau) com dois outros irmãos (18 anos e 5 anos) assintomáticos. A paciente foi encaminhada pelo serviço de Dermatologia do HUB por apresentar baixa estatura e manchas difusas hiperocrômicas. A mãe refere abortamento de repetição e relata que, na gestação da filha, apresentou múltiplos sangramentos, sendo necessário o uso de progesterona. A criança nasceu a termo, de via cesariana, dentro dos parâmetros de normalidade (2.900 g e 49 cm). Desde o nascimento a paciente apresenta manchas hiperocrômicas no pescoço, base das unhas, mãos, pés e pescoço com acentuação das manchas à exposição solar e agravamento do quadro com a idade.

Aos 5 anos apresentou ulcerações na boca e ânus atribuídos a intolerância à lactose e ao glúten, com necessidade de tratamento ambulatorial com antibióticos. A criança frequentou a escola de acordo com a idade e série, não relata atraso no aprendizado ou reprovação escolar. No entanto, aos 9 anos foi diagnosticada com Transtorno do Déficit de Atenção (TDAH). A paciente nega episódios de convulsão ou cirurgia. Menarca aconteceu aos 13 anos, com ciclo menstrual regular.

3.2. Exame físico

Paciente com baixa estatura (149 cm; < 3 percentil), 47 kg (entre os percentis 25 e 50), circunferência frontal-occipital de 54,5 cm (entre os percentis 50 e 98), assimetria facial, orelhas de implantação baixa, prognatismo, filtro longo, lábios grossos, voz anasalada e rouca. Manchas hiperocrômicas difusas, com predomínio em região cervical, lateral e posterior, região inguinal, axilas, virilhas, dorso das mãos, dedos (com predomínio em regiões interfalangeanas e falanges distais), leitos ungueais e pés (Figura 2). Não apresentava hiperpigmentação das mucosas, nem anormalidades na língua sugestivas de glossite ou outras alterações hematológicas.

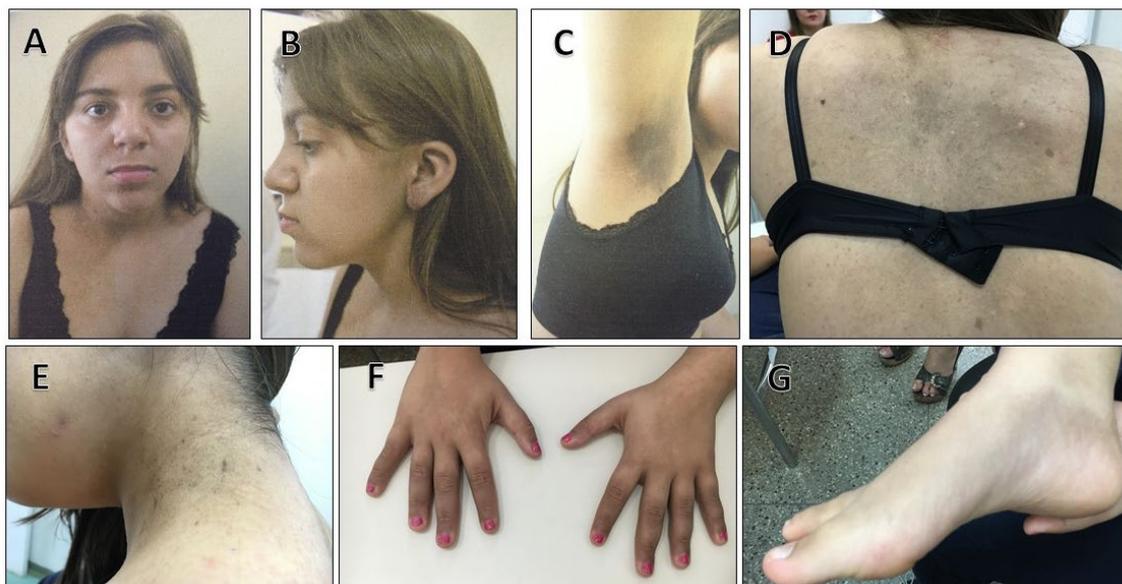


Figura 2. Fotos da paciente mostrando a dismorfia facial (A), orelhas com baixa implantação (B); presença de manchas hipercrômicas: axilas (C); dorso (D); Pescoço (E); Mãos (F) e Pé (G).

Os seguintes exames complementares revelaram: ultrassonografia de pelve e abdômen: normais; Cariótipo: 46,XX [20] (normal para sexo feminino); radiografias de mãos e punhos: idade óssea de 11 anos, conforme o esperado para a idade cronológica à época do exame (12 anos); exames laboratoriais (hemograma completo, anti-transglutaminase; ácido orgânico urinário e cortisol) todos dentro dos parâmetros de referência. Dosagem de vitamina B12, homocisteína e ácido fólico estavam com valores reduzidos em relação aos valores de referência (Tabela 1).

Após a avaliação minuciosa por parte das equipes de Genética e Dermatologia, foi aventada a hipótese de que se tratava de uma deficiência congênita da vitamina B12, secundária a um erro inato do metabolismo. Para comprovar essa hipótese, foi necessária a avaliação de fragmento de pele da paciente por análise ultraestrutural em microscópio eletrônico de transmissão e o sequenciamento do exoma para descobrir a variante causativa da condição patológica da paciente.

Paralelamente, foi iniciada suplementação de vitamina B12 com esquema terapêutico via intramuscular com dose de ataque de 1 mg ao dia por 7 dias, seguido de 1 mg 3 vezes/semana por 3 semanas e, logo após, 1 mg uma vez por mês por 3 meses consecutivos e manteve, por regime oral, dose diária de 1 mg. Após a terapêutica de suplementação da vitamina B12 foram repetidos os exames, sendo observadas as dosagens discriminadas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Exames bioquímicos realizados pré e pós o tratamento com a suplementação da vitamina B12.

Exame	Pré Tratamento	Pós Tratamento	Valor de Referência*
Vitamina B12 (pg/mL)	175	256	180 - 900
Homocisteína (nmol/L)	45.4	14.3	5 - 15
Ácido fólico (ng/mL)	7.59	NR	>3.10

Legenda: NR – Não realizado.

3.3. Resultados da análise ultraestrutural

A análise ao microscópio eletrônico de transmissão de fragmento de pele axilar, representada por porções da epiderme e derme profunda, revelou conservação de estruturas celulares e da lâmina basal na porção da epiderme. Com frequência, notou-se aumento do pigmento de melanina em queratinócitos basais e numerosos melanóforos na derme papilar. Em fibroblastos da porção dérmica foram observados numerosos melanossomos, com formações vacuolares contendo fagócitos fortemente elétron-densos (Figura 3). Não foram observadas alterações ultraestruturais em outras organelas celulares, vasos sanguíneos e em fibrilas colágenas.

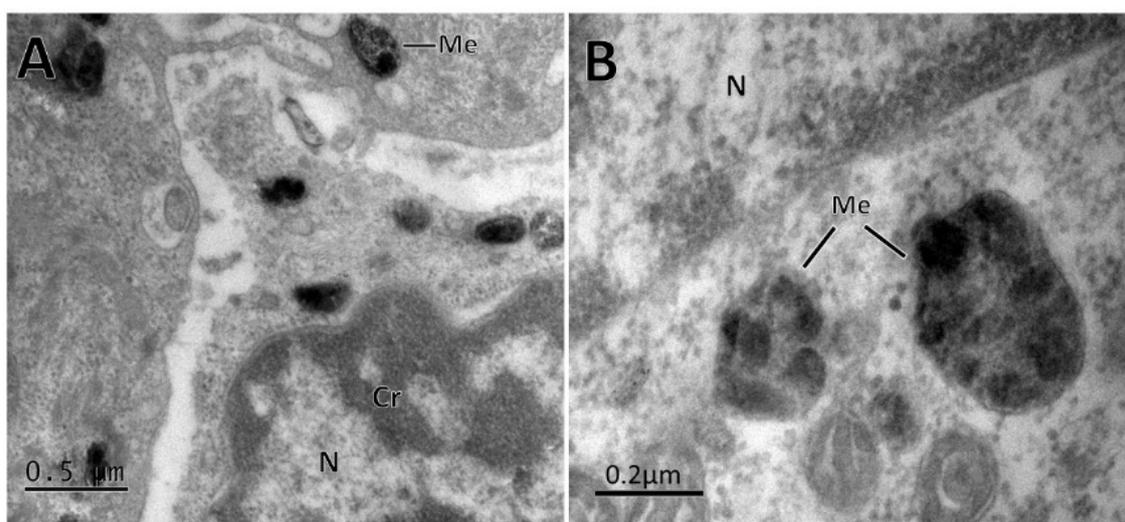


Figura 3. Análise de biópsia de pele por microscopia eletrônica de transmissão. Observa-se o citoplasma de fibroblastos contendo melanossoma com depósitos irregulares elétron-densos. Abreviaturas: (N) núcleo; (Me) melanossoma; (Cr) cromatina.

3.4. Resultados da análise do sequenciamento de nova geração (exoma)

A análise de variantes foi realizada a partir dos dados brutos de sequenciamento dos arquivos FastQ obtidos pela Macrogen. O resultado do exoma foi analisado pela plataforma Franklin (www.genoox.com) seguindo as diretrizes da ACMG (*American College Medical Genetics*) e estabelecidas estratégias para a filtragem para a identificação da variante conforme a Tabela 2 abaixo.

Após a análise do sequenciamento do exoma, foi identificada uma variante em homozigose, (c. 515-516 del 9p.Thr172) no gene *LMBRD1* (NM_018368.4) localizada no éxon 4, do tipo *frameshift*. A variante foi classificada como provavelmente patogênica pela plataforma Franklin de acordo com os critérios do ACMG. A Figura 4 mostra as variantes patogênicas descritas no gene *LMBRD1*.

Tabela 2: Estratégias utilizadas para filtragem das variantes encontradas na análise do exoma da paciente. A análise foi realizada pela plataforma Franklin (Genoox).

Fenótipo	Região gênica	Efeito	Zigosidade	Frequência	Confiança
Baixa estatura	Exonic	<i>Missense</i>	Homozigoto	Rara	Baixa
Manchas hipercrômicas	Splice Donor (+2)	<i>Frameshift</i>	Heterozigoto	Muito rara	Média
	Splice Acceptor (-2)	<i>Non frameshift</i>			Alta
	Região de Splice (+-3->10)	<i>Start Gain</i> <i>Start Loss</i> <i>Stop Loss</i>			

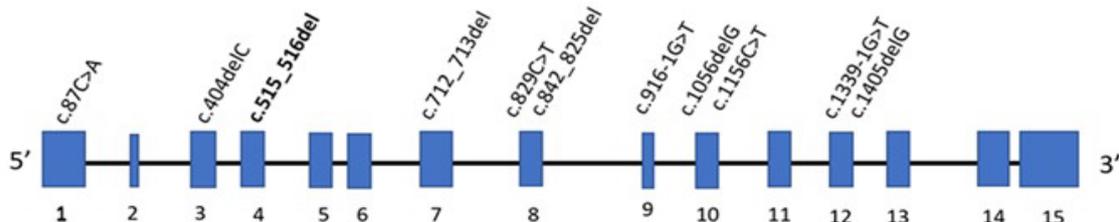


Figura 4. Esquema gráfico exemplificando as variantes patogênicas descritas no gene *LMBRD1* que já foram relacionadas com a deficiência da *cb1F*. A variante em negrito foi identificada na paciente deste estudo.

4. DISCUSSÃO

Após a análise integral e multissistêmica da paciente, que englobou desde a avaliação dos dados clínicos, exames laboratoriais, biópsia de pele e o resultado do exoma, foi possível estabelecer a etiologia da doença e iniciar o tratamento da paciente. Apesar do diagnóstico tardio trata-se de doença congênita de causa genética que faz parte do grupo de doenças conhecidas como erros inatos do metabolismo da cobalamina. Poucos são os relatos que descrevem variantes no gene *LMBRDI*, tendo até o momento, menos de 20 casos relatados.

A apresentação clínica desses casos é altamente heterogênea, com registro de pacientes oligossintomáticos e outros com início precoce de manifestações graves, levando a limitações substanciais e até morte prematura (Tabela 3) (Genin et al., 2011; Mori, Ando, & Kukita, 2001).

Pacientes com deficiência na cblF têm a maioria das manifestações fenotípicas geralmente se apresentando após o nascimento: retardo de crescimento pós-natal, dificuldades de alimentação, atraso no desenvolvimento, convulsões, letargia e hipotonia, além de malformações cardíacas congênitas. Esses pacientes com erros inatos do metabolismo da cobalamina também podem apresentar manifestações semelhantes àquelas observadas na deficiência nutricional de vitamina B12, como anemia megaloblástica, glossite e hiperpigmentação da pele. O quadro clínico heterogêneo e inespecífico pode dificultar o diagnóstico precoce (Constantinou et al., 2015; Dassa & Bouige, 2001; Fettelschoss et al., 2017; Genin et al., 2011; Mori et al., 2001; Van Roermund, Ijlst, Wagemans, Wanders, & Waterham, 2014), como pode ser visto na Tabela 3.

O diagnóstico tardio dessa paciente se deve provavelmente ao grau de apresentação de sintomas, que foram relativamente leves (transtorno de déficit de atenção, baixa estatura, características dismórficas leves e hiperpigmentação na pele) e que só foram melhor investigados devido a hiperpigmentação cutânea (queixa principal da paciente e motivo que a fez buscar assistência médica). No entanto, dentre os casos descritos de alteração no *LMBRDI* há apenas um relato de alterações da coloração da pele (Altawil et al., 2020). Por sua vez, Rutsch et al. (2009) descreveram um paciente portador de variante patogênica em homozigose com efeito *frameshift* c.515_516 del (a mesma variante da paciente descrita neste trabalho) que, porém, manifestou fenótipo grave com

múltiplas malformações como fistula traqueoesofágica, sem, contudo, a presença de manchas hiperocrômicas.

Takeichi et al. (2015) também correlacionaram a presença das manchas difusas em um relato de caso de uma paciente portadora de variante em homozigose no gene *ABCD4* (c.423C>G;p.Asn 14Lys), que apresentou como sinais clínicos a presença de hiperpigmentação cutânea progressiva difusa, alterações hematológicas e leve clareamento no cabelo. A paciente não relatou alterações de pigmentação em mucosas, ou qualquer alteração neurológica. A avaliação de exames bioquímicos detectou aumento da homocisteína plasmática, baixo índice de cobalamina em sangue periférico e elevada dosagem de ácido metilmalônico na urina (Takeichi et al., 2015).

O achado de hiperpigmentação cutânea é mais correlacionado a variantes patogênicas no gene *ABCD4* que estão associadas ao distúrbio de cblJ. Até o momento, a maior parte dos 6 casos descritos envolvendo de variante no gene *ABCD4*, apresentaram alterações na pigmentação cutânea (Altawil et al. 2020; Fettelschoss et al. 2017a; Rutsch et al. 2009; Takeichi et al. 2015; Vasiliou, Vasiliou, and Nebert 2009; Vassiliadis et al. 1991).

A duas cobalaminas (F e J) têm papel crítico no transporte intracelular dos lisossomos e por essa razão pode haver a sobreposição de sinais clínicos nos defeitos associados a essas duas cobalaminas (Coelho et al., 2012). Um dos mecanismos que poderia explicar a hiperpigmentação difusa da pele afetando preferencialmente pescoço, axilas, palmas das mãos e dedos, seria a incontinência pigmentar.

A incontinência na transferência de melanina entre melanócitos e queratinócitos, pode ter como resultado alteração pigmentar (hipercromia cutânea). Esse processo acontece quando o pigmento da melanina fica no citoplasma de fibroblastos no extrato dérmico, não ocorrendo o tráfego migratório da melanina para melanócitos e queratinócitos na porção epidérmica da pele. Acredita-se que essa incontinência de tráfego migratório é resultado do aumento do estresse oxidativo por hiperprodução da homocisteína, que por sua vez altera a oxidação da glutathione, a qual leva à supressão da inibição normal da tirosinase com subsequente estímulo aumentado da melanogênese (Nagapan, Lim, & Basri, 2019).

Essa hipótese é corroborada pela presença das manchas hiperocrômicas difusas e poderia explicar também os achados de escurecimento da pele quando exposta ao sol, já que a ação ultravioleta da luz solar levaria à depleção adicional de glutathione (Altawil et al., 2020; Sremba et al., 2020).

Tabela 3: Comparação de dados clínicos de relatos de casos descritos na literatura com deficiência de cb1F e variantes de LMBRD1 com as manifestações clínicas da paciente.

Autor Ano	Rosenblatt et al.,	Shih et al.,	Wong et al.,	Alfadel et al.,	MacDonald et al.,	MacDonald et al.,	Waggoner et al.,	Oladipo et al.,	Rutsch et al.,	Gailus et al.,	Miousse et al.,	Armour et al.,	Constantinou et al.,	Tong et al.,	AlTawil et al.,					
Variável/Sintoma	1986	1989	1992	2011	1998	1998	1998	2011	2009	2009	2009	2009	2009	2009	2009	2011	2013	2015	2019	2020
Sexo	F	F	F	F	M	M	F	F	M	F	F	M	M	M	M	F	F	M	F	F
Idade	12d	18d	6m	6m	11a	RN	1m	1m	3 sem	2m	4 sem	3 sem	10m	1m	-	6d	RN	1 m	RN	4m
Estomatite	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA
Glosite	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	NA	NA
Infecções recorrentes	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
Rasch	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	NA	-
Atraso no desenvolvimento	-	-	+	+	.	.	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
DD/ID	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Convulsão	+	-	+	+	-	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	NA
Hipotonia	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	NA
Anemia megaloblástica	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Neutropenia	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	NA	+
Trombocitopenia	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	NA	+
Alteração no fígado	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Alteração no rim	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	Agenesia	-	-
Dismorfias	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	+	-	+	-	-
Cardiopatía congénita	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	NA
Heterocromia	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	NA	+
Baixa estatura	NA	NA	-	-	NA	NA	+	+	+	NA	NA	+	NA	NA	-	-	-	+	NA	+
OFC	NA	NA	Macro	Macro	NA	NA	Normal	Normal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Micro	Normal	Normal	+	NA	Micro
Alteração dentária	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	NA	-	-	-	-	+

Legenda- LDD/ID: Deficiência intelectual; OFC: Perímetro encefálico; F: feminino; M: masculino; d: dia; m: mês; RN: recém-nascido; sem: semana; NA: não avaliado; +: presente; -: ausente.

(AlTawil et al., 2020; Armour et al., 2013; Constantinou et al., 2015; Miousse et al., 2009; Miousse, Watkins, & Rosenblatt, 2011; Tong, Yang, Chen, & Zhao, 2019)

(Watkins & Rosenblatt, 1986) (Alfadel, Lillquist, Davis, Junker, & Stockler-Ipsiroglu, 2011; Gailus et al., 2010; Oladipo et al., 2011; Rutsch et al., 2009; Takeichi et al., 2015) (Shih et al., 1989) (Waggoner, Ueda, Mantia, & Dowton, 1998)(WONG, LOW, LAU, NICHOLLS, & CHAN, 1992)(Oladipo et al., 2011).

Até o momento não se sabe ao certo a influência das proteínas de transporte lisossomal cblF e cblJ na melanogênese. Por isso são necessários mais estudos para compreender a atuação da proteína LMBRD1 no transporte das cobalaminas e o desbalanço na formação de melanossomos em fibroblastos no extrato dérmico.

O diagnóstico de deficiências de cobalaminas pode ser feito a partir do exame de triagem neonatal ampliado o que permite um diagnóstico precoce para pacientes com deficiência de cblf. No entanto, o diagnóstico de pacientes nascidos antes da implementação do exame de triagem neonatal ampliado é desafiador, em parte devido às apresentações clínicas altamente heterogêneas e também porque os pacientes levemente afetados podem demorar mais para iniciar a investigação adequada.

Por fim, a deficiência de cblF deve ser considerada em pacientes que apresentam hiperpigmentação cutânea com ou sem baixa estatura e atraso no desenvolvimento. Embora a confirmação possa exigir um painel de sequenciamento de nova geração ou até mesmo sequenciamento de todo o exoma, pacientes com suspeita de erro inato no metabolismo das cobalaminas podem lançar mão de testes mais amplamente disponíveis, como dosagem de vitamina B12, de homocisteína e de ácido metilmalônico séricos, que são uma primeira estratégia de avaliação desses pacientes.

A raridade desse distúrbio é contrabalanceada por um tratamento prontamente disponível, que poderia prevenir muitas das complicações deletérias da deficiência de vitamina B12 se instalado no início do curso da doença.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfadhel, M., Lillquist, Y. P., Davis, C., Junker, A. K., & Stockler-Ipsiroglu, S. (2011). Eighteen-year follow-up of a patient with cobalamin F disease (cblF): Report and review. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 155(10), 2571–2577. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34220>
- Altawil, L., Alshihry, H., Ahmed, H., Shamseldin, H. E., & Alkuraya, F. (2020). Vitamin B12 deficiency secondary to cobalamin F deficiency simulating dyskeratosis congenita. *JAAD Case Reports*, 6(9), 882–885. <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2020.07.011>
- Armour, C. M., Brebner, A., Watkins, D., Geraghty, M. T., Chan, A., & Rosenblatt, D. S. (2013). A patient with an inborn error of vitamin B12 metabolism (cblf) detected by newborn screening. *Pediatrics*, 132(1). <https://doi.org/10.1542/peds.2013-0105>
- Banerjee, R., Gherasim, C., & Padovani, D. (2009). The tinker, tailor, soldier in intracellular B12 trafficking. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(4), 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.07.007>
- Buers, I., Pennekamp, P., Nitschke, Y., Lowe, C., Skryabin, B. V., & Rutsch, F. (2016). Lmbrd1 expression is essential for the initiation of gastrulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(8), 1523–1533. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jcmm.12844>
- Chiang, T. T., Hung, C. T., Wang, W. M., Lee, J. T., & Yang, F. C. (2013). Recreational nitrous oxide abuse-induced Vitamin B12 deficiency in a patient presenting with hyperpigmentation of the skin. *Case Reports in Dermatology*, 5(2), 186–191. <https://doi.org/10.1159/000353623>
- Coelho, D., Kim, J. C., Miousse, I. R., Fung, S., Du Moulin, M., Buers, I., ... Baumgartner, M. R. (2012). Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nature Genetics*, 44(10), 1152–1155. <https://doi.org/10.1038/ng.2386>
- Constantinou, P., D'Alessandro, M., Lochhead, P., Samant, S., Bisset, W. M., Hauptfleisch, C., & Dean, J. (2015). A New, Atypical Case of Cobalamin F Disorder Diagnosed by Whole Exome Sequencing. *Molecular Syndromology*, 6(5), 254–258. <https://doi.org/10.1159/000441134>
- Dassa, E., & Bouige, P. (2001). The ABC of ABCs: A phylogenetic and functional

- classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology*, 152(3–4), 211–229. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01194-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01194-9)
- Deme, J. C., Hancock, M. A., Xia, X., Shintre, C. A., Plesa, M., Kim, J. C., ... Coulton, J. W. (2014). Purification and interaction analyses of two human lysosomal vitamin B12 transporters: LMBD1 and ABCD4. *Molecular Membrane Biology*, 31(7–8), 250–261. <https://doi.org/10.3109/09687688.2014.990998>
- Fettelschoss, V., Burda, P., Sagné, C., Coelho, D., De Laet, C., Lutz, S., ... Baumgartner, M. R. (2017). Clinical or ATPase domain mutations in ABCD4 disrupt the interaction between the Vitamin B12-trafficking proteins ABCD4 and LMBD1. *Journal of Biological Chemistry*, 292(28), 11980–11991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784819>
- Gailus, S., Suormala, T., Malerczyk-Aktas, A. G., Toliat, M. R., Wittkamp, T., Stucki, M., ... Rutsch, F. (2010). A novel mutation in LMBRD1 causes the cblF defect of vitamin B12 metabolism in a Turkish patient. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-9032-7>
- Genin, E. C., Geillon, F., Gondcaille, C., Athias, A., Gambert, P., Trompier, D., & Savary, S. (2011). Substrate specificity overlap and interaction between adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) and adrenoleukodystrophy-related protein (ALDRP/ABCD2). *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8075–8084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211912>
- Huemer, M., & Baumgartner, M. R. (2019). The clinical presentation of cobalamin-related disorders: From acquired deficiencies to inborn errors of absorption and intracellular pathways. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42(4), 686–705. <https://doi.org/10.1002/jimd.12012>
- Husny, A. S. El, & Fernandes-Caldato, M. C. (2006). Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura. *Revista Paraense de Medicina*, 20(2), 41–45. <https://doi.org/10.5123/s0101-59072006000200008>
- Kawaguchi, K., Okamoto, T., Morita, M., & Imanaka, T. (2016). Translocation of the ABC transporter ABCD4 from the endoplasmic reticulum to lysosomes requires the escort protein LMBD1. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep30183>
- Miousse, I. R., Watkins, D., Coelho, D., Rugar, T., Crombez, E. A., Vilain, E., ... Rosenblatt, D. S. (2009). Clinical and Molecular Heterogeneity in Patients with the CblD Inborn Error of Cobalamin Metabolism. *Journal of Pediatrics*, 154(4), 551–

556. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.10.043>
- Miousse, I. R., Watkins, D., & Rosenblatt, D. S. (2011). Novel splice site mutations and a large deletion in three patients with the cblF inborn error of vitamin B12 metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, *102*(4), 505–507. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.01.002>
- Mori, K., Ando, I., & Kukita, A. (2001). Generalized hyperpigmentation of the skin due to vitamin B12 deficiency. *Journal of Dermatology*, *28*(5), 282–285. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2001.tb00134.x>
- Nagapan, T. S., Lim, W. N., & Basri, D. F. (2019). Oral supplementation of L-glutathione prevents ultraviolet B-induced melanogenesis and oxidative stress in BALB / c mice. *68*(June), 541–548.
- Oladipo, O., Rosenblatt, D. S., Watkins, D., Miousse, I. R., Sprietsma, L., Dietzen, D. J., & Shinawi, M. (2011). Cobalamin F disease detected by newborn screening and follow-up on a 14-year-old patient. *Pediatrics*, *128*(6). <https://doi.org/10.1542/peds.2010-3518>
- Rutsch, F., Gailus, S., Miousse, I. R., Suormala, T., Sagné, C., Toliat, M. R., ... Nürnberg, P. (2009). Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nature Genetics*, *41*(2), 234–239. <https://doi.org/10.1038/ng.294>
- Rutsch, F., Gailus, S., Suormala, T., & Fowler, B. (2011). LMBRD1: The gene for the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *34*(1), 121–126. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9083-9>
- Shih, V. E., Axel, S. M., Tewksbury, J. C., Watkins, D., Cooper, B. A., & Rosenblatt, D. S. (1989). Defective lysosomal release of vitamin B12 (cblF): A hereditary cobalamin metabolic disorder associated with sudden death. *American Journal of Medical Genetics*, *33*(4), 555–563. <https://doi.org/10.1002/AJMG.1320330431>
- Sloan, J. L., Carrillo, N., Adams, D., & Venditti, C. P. (1993). Disorders of Intracellular Cobalamin Metabolism. *GeneReviews*®, *1*, 1–42.
- Sremba, L., McCandless, S., & Baker, P. (2020). Concerning “Diagnostic Exome Sequencing and Tailored Bioinformatics of the Parents of a Deceased Child with Cobalamin Deficiency Suggests Digenic Inheritance of the MTR and LMBRD1 Genes” by Farwell Gonzalez et al. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *43*(2), 157–158. <https://doi.org/10.1002/jimd.12148>
- Takeichi, T., Hsu, C. K., Yang, H. S., Chen, H. Y., Wong, T. W., Tsai, W. L., ... McGrath,

- J. A. (2015). Progressive hyperpigmentation in a Taiwanese child due to an inborn error of vitamin B12 metabolism (cblJ). *British Journal of Dermatology*, 172(4), 1111–1115. <https://doi.org/10.1111/bjd.13413>
- Tong, F., Yang, R. L., Chen, R., & Zhao, Z. Y. (2019). The first case of cobalamin F disorder in China: Report and literature review. *Hong Kong Journal of Paediatrics*, 24(1), 43–47.
- Van Roermund, C. W. T., Ijlst, L., Wagemans, T., Wanders, R. J. A., & Waterham, H. R. (2014). A role for the human peroxisomal half-transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(4), 563–568. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.001>
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. 3(3), 281–290.
- Vassiliadis, A., Rosenblatt, D. S., Cooper, B. A., & Bergeron, J. J. M. (1991). Lysosomal cobalamin accumulation in fibroblasts from a patient with an inborn error of cobalamin metabolism (cblF complementation group): Visualization by electron microscope radioautography. *Experimental Cell Research*, 195(2), 295–302. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90376-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90376-6)
- Waggoner, D. J., Ueda, K., Mantia, C., & Dowton, S. B. (1998). Methylmalonic aciduria (cblF): Case report and response to therapy. *American Journal of Medical Genetics*, 79(5), 373–375. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19981012\)79:5<373::AID-AJMG8>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19981012)79:5<373::AID-AJMG8>3.0.CO;2-K)
- Watkins, D., & Rosenblatt, D. S. (1986). Failure of lysosomal release of vitamin B12: A new complementation group causing methylmalonic aciduria (cblF). *American Journal of Human Genetics*, 39(3), 404–408.
- WONG, S. -N, LOW, L. C., LAU, Y. -L, NICHOLLS, J., & CHAN, M. Y. (1992). Immunodeficiency in methylmalonic acidemia. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 28(2), 180–183. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.1992.tb02638.x>

Capítulo II

*Variante patogênica no gene ENPP5 em
paciente com displasia esquelética e anomalias
dentárias*

1. INTRODUÇÃO

As desordens esqueléticas são um grupo heterogêneo de doenças genéticas que afetam o desenvolvimento e a homeostasia do esqueleto, podendo acometer entre 2 a 4 indivíduos a cada 10.000 nascimentos. Até pouco tempo, o diagnóstico dessas síndromes era feito exclusivamente pela avaliação clínica associada à análise de imagem e, esporadicamente, pela análise histopatológica (Barkova et al., 2015b). Nos últimos anos, as bases moleculares de numerosas desordens têm sido esclarecidas e um número crescente de genes vem sendo identificados. Atualmente, 436 desordens esqueléticas são classificadas em 42 grupos com envolvimento de mais de 300 genes na patogênese (Bonafe et al. 2015; Mortier et al. 2019).

De acordo com a nosologia de 2015 (Bonafe et al., 2015) as doenças esqueléticas foram subdivididas em: I) Doenças do metabolismo ósseo, aquelas que comprometem a homeostasia da matriz mineralizada do osso; II) Malformações esqueléticas e/ou síndromes reducionais, síndromes que comprometem o segmento corporal ou a ausência de algum membro; III) Disostoses, grupo de doenças que afetam um osso ou um grupo limitado de ossos, mas que não comprometem a proporcionalidade corporal, mineralização e densidade óssea; IV) Displasias esqueléticas, ou osteocondrodismplasias, constituem um grupo heterogêneo de desordens que afetam o crescimento e desenvolvimento do esqueleto, normalmente relacionadas a baixa estatura (Rimoin et al. 2007; Warman, Cormier-daire, et al. 2011; Mortier et al. 2019)

As displasias esqueléticas apresentam alta morbimortalidade e baixa prevalência na população (Barbosa-Buck et al., 2012). As manifestações clínicas dentro desse grupo variam desde osteoartropatia precoce (#259100 OMIM) em indivíduos com estatura normal, até as formas mais graves e letais com óbito perinatal como na displasia tanatofórica (#187600 OMIM) (Abarca, Rodríguez, Casas, & Espíndola, 2014). Os sinais mais frequentes nas displasias esqueléticas são baixa estatura, seguida de deformidades ósseas, presença de fraturas, luxações, contraturas articulares, desproporção de membros, alterações craniofaciais, além de comprometimento sistêmico, como a restrição do crescimento dos ossos da caixa torácica e com isso, problemas pulmonares (Krakow et al., 2008; Krakow & Rimoin, 2010).

Múltiplas displasias esqueléticas apresentam manifestações craniofaciais e alterações ósseas, podendo ser citadas dentre elas a displasia craniometafisária (CMD) e a displasia metafisária (Warman, Cormier-Daire, et al., 2011). A displasia craniometafisária, apresenta herança autossômica dominante (CMDD; #123000 OMIM) ou autossômica recessiva (CMDR; #218400 OMIM), caracterizada principalmente por macrocefalia, hiperostose e esclerose progressiva dos ossos do crânio, alargamento da ponte do nariz, hipertelorismo, palato ogival, assimetria da mandíbula, paralisia facial resultante da compressão de nervos cranianos, perda auditiva e alterações oftalmológicas. Outras manifestações incluem alargamento da região metafisária, esclerose de falange, metacarpo e *genu valgum* (Kornak et al., 2010; Reichenberger et al., 2001). Em relação as manifestações bucais existem poucos relatos detalhados na literatura. Em 2014, estudo de série de casos avaliou as manifestações orodentais em 7 pacientes portadores de CMDD e todos os pacientes avaliados apresentaram atraso na erupção dentária dos dentes permanentes, aumento das dimensões buco palatina da maxila e dimensões buco lingual da mandíbula, sendo a mandíbula mais afetada. No entanto, a densidade óssea da mandíbula e maxila foram inalteradas (Lin, Chen, Cheng, Hu, & Hsueh, 2014; Ramseyer, Leonard, & Stacy, 1993). Até o presente, somente variantes no gene *Progressive ankylosis protein homolog* humano *ANKH* têm sido associadas com a CMDD. A proteína ANKH é uma proteína transmembrana, altamente conservada, que participa principalmente no transporte de pirofosfato e atua como um potente inibidor da mineralização (Reichenberger et al., 2001; Singh, Qin, Medarametla, & Hegde, 2016).

O termo “displasia metafisária” reagrupa 10 tipos de desordens que possuem modo de herança autossômica dominante e recessiva, assim como heterogeneidade genética, ou seja, diferentes alterações genéticas causando a mesma doença (Bonafe et al., 2015). A displasia metafisária autossômica recessiva também chamada doença de Pyle (#265900 OMIM) é associada a variantes no gene *SFRP4* e pode ser diagnóstico diferencial de CMD (Simsek Kiper et al., 2016). Esse grupo de displasias esqueléticas apresenta como principais sinais clínicos o alargamento na região das metáfises, osso cortical fino, *genu valgum*, e por vezes, fraturas. Em alguns tipos de displasia metafisária são descritas alterações orodentais tais como paralisia facial devido a compressão do nervo facial, rarefação generalizada dos ossos do complexo maxilomandibular, afinamento cortical da maxila, mandíbula e ossos alveolares, alargamento do côndilo e atraso na erupção dentária (Narayananan, Ashok, Mamatha, Rajeshwari, & Prasad, 2006).

A grande heterogeneidade fenotípica das displasias esqueléticas representa um desafio para a definição do diagnóstico. O avanço das técnicas moleculares tem permitido uma contínua revisão da classificação das displasias esqueléticas e a descrição de novas condições sindrômicas (Bonafe et al., 2015). O sequenciamento de nova geração tem sido uma ferramenta essencial no entendimento das bases moleculares dessas desordens e somada a outros critérios diagnósticos, permite correlacionar o fenótipo-genótipo de displasias esqueléticas pouco estudadas ou ainda não descritas.

A maioria das displasias esqueléticas são desordens monogênicas e seguem um padrão de herança autossômico dominante, autossômico recessivo ou ligado ao cromossomo X. Nos casos em que o mesmo fenótipo pode ser causado por variantes em vários genes ou quando a etiologia genética é desconhecida, o sequenciamento de exoma ou de nova geração é o método de escolha para o diagnóstico molecular. Como o sequenciamento de exoma ou de genoma fornece muitas variantes raras, a correlação com uma caracterização fenotípica detalhada é essencial na interpretação dos resultados (Mortier et al., 2019).

As desordens esqueléticas são frequentemente acompanhadas de malformações craniofaciais e a descrição detalhada das manifestações bucais pode contribuir no diagnóstico (Gorlin, 2001). Apesar da avaliação odontológica dos pacientes ainda ser negligenciada, nos últimos anos, estudos de caracterização de manifestações bucais têm contribuído no diagnóstico de diversas síndromes inclusive de displasias esqueléticas (Acevedo, Poulter, Alves, de Lima, et al., 2015). Nos últimos dezesseis anos, a Clínica de Atendimento de Pacientes Portadores de Anomalias Dentárias e o Serviço de Genética do Hospital Universitário de Brasília – HUB têm realizado um esforço conjunto para caracterizar de maneira detalhada e sistemática as manifestações fenotípicas de pacientes sindrômicos. Contudo, apesar desse esforço, ainda há pacientes sem diagnóstico definido. Dentre os diversos casos acompanhados nesses serviços, destaca-se uma família consanguínea na qual o caso índice apresenta alterações esqueléticas, crescimento proeminente da maxila e alterações metabólicas.

Portanto, o presente estudo tem por finalidade a caracterização fenotípica e genotípica, pela realização de sequenciamento de nova geração, de um paciente portador de displasia esquelética com comprometimento craniofacial e metabólico.

2. MÉTODOS

2.1. Participante do estudo

O caso índice avaliado neste estudo é um paciente do sexo masculino com consanguinidade parental, apresentando crescimento progressivo do complexo maxilo-mandibular, hiperplasia gengival, alterações esqueléticas e metabólicas. Teve por hipótese diagnóstica inicial displasia craniometafisária ou displasia metafisária. As hipóteses diagnósticas iniciais se basearam principalmente nas alterações esqueléticas e craniofaciais, porém, devido ao comprometimento cognitivo e outras alterações sistêmicas, não foi possível determinar o diagnóstico. A descrição clínica e a caracterização fenotípica do paciente foram realizadas pela equipe de geneticistas do Hospital Sarah Kubitschek e do Hospital Universitário de Brasília-HUB. A caracterização das alterações orais foi realizada pela avaliação de dados e exames do prontuário da Clínica de Atendimento de Pacientes Portadores de Anomalias Dentárias, na Unidade de Saúde Bucal, HUB.

Após a avaliação clínica do paciente e de acordo com a necessidade terapêutica odontológica, foram coletados fragmentos de gengiva para avaliação histopatológica, ultraestrutural, cultura de fibroblastos e extração de DNA.

2.2. Processamento para avaliação morfológica de células e tecidos

Amostras de gengiva foram coletadas durante cirurgias realizadas com finalidade terapêutica e foram cedidas pelo responsável, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com o objetivo de estabelecer o cultivo celular primário e realizar análise histopatológica e ultraestrutural. Os fragmentos de tecido gengival do paciente foram divididos em 3 porções menores e armazenados distintamente de acordo com o protocolo de processamento de cada uma das três técnicas: I) cultura de células, II) avaliação histopatológica e III) avaliação da ultraestrutura. Amostras de gengiva de indivíduos controle, pareados por idade e sexo, também foram coletadas e analisadas de forma idêntica, sob os mesmos protocolos. Esses indivíduos controle não sindrômicos, possuíam tecido gengival íntegro e eram oriundos do ambulatório da odontologia, pois estavam em planejamento eletivo para a retirada do terceiro molar (unicamente).

2.3. Processamento para avaliação celular

2.3.1. Estabelecimento de cultura primária

Imediatamente após retirada do tecido gengival dos pacientes (três indivíduos controle e do paciente síndrômico) as amostras foram transferidas para tubos cônicos contendo 5 mL de meio de cultura (DMEM) gelado suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 1% de anfotericina B, para o estabelecimento de culturas por meio da técnica explante. O fragmento da gengiva foi seccionado em pequenos fragmentos e transferidos para placas de cultura de 6 poços padronizando 1 fragmento por poço. Em seguida, foram adicionados 2 mL de meio DMEM suplementado em cada poço. As placas foram mantidas em incubadora à 37 °C, com 5% de CO₂ e em ambiente umidificado para o crescimento celular, sendo o meio de cultura renovado a cada 3 dias. Atingida a confluência de cerca de 80%, as células foram removidas das placas por meio da adição de solução de tripsina a 0,5 % e subcultivadas (5×10^5 células/placa) em placas de 100 mm contendo meio de cultura (DMEM suplementado). Após completa expansão, as células foram novamente tripsinizadas e parte delas foi subcultivada para realização dos experimentos com as linhagens celulares enquanto a outra parte foi criopreservada para posterior utilização. Cada processo de tripsinização e subcultura foi considerado como sendo uma passagem celular, de modo que a “passagem 0” foi definida como o estabelecimento da cultura.

2.3.2. Morfometria dos núcleos (imunofluorescência com DAPI)

Com o estabelecimento das culturas primárias de indivíduos controle e do paciente síndrômico, as amostras foram analisadas em contraste de fase (Zeiss Primo Vert) para avaliar a morfologia e a confluência das células na placa de cultivo. A investigação morfológica do grupo de células controle e das células do paciente síndrômico foram analisadas por ensaio de imunofluorescência com DAPI.

As células foram semeadas sobre lamínulas de vidro em placas de cultivo de 60 mm, na densidade de 10^4 células. Após aproximadamente 3 semanas de cultivo com meio DMEM completo, a quantidade e distribuição celular estavam adequadas para análise da morfologia por meio da imunofluorescência. O meio de cultivo foi removido, as células foram lavadas em PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 min e, em seguida, lavadas novamente com PBS. As lâminas foram montadas com a solução de montagem

contendo DAPI e analisadas ao microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager 2). Foi feito o registro dos campos das lâminas de modo a obedecer ao critério estabelecido de 50 imagens para cada paciente fotografadas com o aumento de 20x. As imagens foram analisadas e medidas pelo sistema ImageJ (Schneider, Rasband, Eliceiri, 2012).

2.3.3. Avaliação da atividade mitocondrial (MTT)

Para avaliar a proliferação celular em meio de cultivo foi utilizado um ensaio de mensuração de atividade mitocondrial. O ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) consiste em uma avaliação colorimétrica baseada na capacidade da mitocôndria em metabolizar o composto MTT, um sal de coloração amarelada que quando reduzido a cristal de formazan, apresenta coloração azul púrpura. Dessa forma, a quantidade de formazan é aferida por espectrometria, podendo assim, correlacionar a capacidade metabólica da mitocôndria com a viabilidade celular. Quanto maior a quantidade de formazan, maior a viabilidade celular.

Neste ensaio foram utilizadas células de 3 indivíduos controle e do paciente síndrômico em triplicata. As células de cada paciente foram distribuídas em triplicata em 4 placas de 46 poços referindo os períodos de 1, 3, 7 e 10 dias de cultivo, com densidade de aproximadamente 10^6 células por poço. Cada linhagem foi plaqueada em 9 poços contendo 10 μ L de meio DMEM e incubadas de acordo com o período pré-determinado. A solução de MTT foi preparada a 5 mg/mL em PBS e após os períodos de 1, 3, 7 e 10 dias de cultivo, foi adicionado 10 μ L da solução de MTT em cada poço com posterior incubação protegida da luz por 4h à 37 °C. Após esse período, o conteúdo do poço foi aspirado e adicionou-se 100 μ L de DMSO para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram homogeneizadas levemente por 5 min e após essa etapa aferiu-se a absorbância em leitor de microplaca a 570 nm. A partir dos dados obtidos dos tempos e dos pacientes, foi confeccionada uma curva de absorbância vs tempo a fim de comparar a proliferação celular das células do paciente síndrômico e dos controles.

2.4. Análise estatística

Os dados oriundos do ensaio de proliferação celular e da análise morfológica dos núcleos apresentaram distribuição não-normal no teste de Shapiro-Wilk e foram submetidos à análise não paramétrica usando o teste de Mann-Whitney em 5% de nível

de significância. Todos os dados foram analisados utilizando o programa SAS[®] (v. 9.3, Cary, North Carolina).

2.5. Processamento para avaliação histopatológica

As amostras de gengiva destinadas ao processamento histopatológico foram fixadas em paraformaldeído (4%) por 24 horas, desidratadas em série alcóolica crescente, mergulhadas em etanol absoluto e diafanizadas com solução álcool:xilol na proporção 1:1 (v/v), seguido de três banhos de xilol 100%, para posterior etapa de inclusão com Paraplast[®] à 59 °C. O material foi incluído em blocos de Paraplast[®] e após a solidificação, foram seccionados com 5 µm de espessura utilizando micrótomo Leica RM2125RT. As secções seriadas foram colhidas em lâminas de vidro e mantidas na estufa à 37 °C por pelo menos 4 horas, para aderência dos cortes à lâmina. Após esse procedimento, as primeiras lâminas de cada série de cortes (lâmina 1, 6 e 11) foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E), permanecendo mergulhadas durante três minutos em solução de hematoxilina básica, recebendo, em seguida, banho em água corrente por trinta segundos e então submersas em solução de eosina por dois minutos, montadas com Entellan[®] e posteriormente observadas em microscópio de luz Axio[®], Zeiss (Itaim Bibi, Brasil).

2.6. Colorações especiais

Para melhor caracterizar o tecido conjuntivo gengival foram realizadas a coloração de *Tricrômico de Masson*, visando identificar a composição da fibrose do tecido (fibras colágenas) enquanto a coloração *Verhoeff* teve por objetivo identificar as fibras elásticas no tecido.

2.6.1. *Tricrômico de Masson*

Foi realizada coloração tricrômico de Masson de acordo com Santos, 2014. Após a desparafinização e hidratação dos tecidos, as lâminas foram imersas na solução de hematoxilina férrica de Weigart durante 10 minutos e em seguida lavadas em água corrente e passadas na água amoniacal até que os cortes ficassem azuis. Após lavagem, as amostras foram colocadas em água destilada, depois imersas por 10 min na solução de fucsina Ponceau, seguido de lavagem em água destilada. As lâminas foram mergulhadas em ácido fosfomolibídico por 3 min antes de serem coradas com a solução verde luz, durante 1

min. Ao final desse procedimento, o excesso de corante foi eliminado na água acetificada e as lâminas desidratadas com álcool e tolueno para a montagem em Entellan[®].

2.6.2. Coloração de Verhoeff

A coloração de *Verhoeff* seguiu o protocolo de acordo com (Santos, 2014). Os cortes foram previamente desparafinizados, hidratados e lavados em água destilada. As lâminas ficaram mergulhadas em solução de hematoxilina por 1 hora e após transcorrido o tempo, lavadas em água corrente para remover o excesso de corante. Para diferenciar a presença de fibra elástica foi necessário colocar gotas da solução de cloreto férrico em concentração de 2% sobre os cortes e avaliar a contracoloração pela análise microscópica (as fibras elásticas são coradas em preto). Após a contracoloração, os cortes foram lavados em água corrente por cinco minutos, passaram pelo banho em álcool 95% e novamente foram lavados em água corrente por 5 minutos. Feito este processo, os cortes foram corados com a solução de Van Gieson por cinco minutos, lavados em água destilada a fim de retirar o excesso de corante, desidratados, clarificados com concentração de Xilol e a lâmina finalizada com Entellan[®].

2.7. Processamento para imunohistoquímica

Os tecidos seccionados com 5 µm de espessura foram reidratados em gradiente alcoólico e imersos em banho-maria à 95 °C com tampão citrato 0.002M pH 6,0 por 20 minutos. Os cortes permaneceram imersos por 15 min em peróxido de hidrogênio 3% (10 volumes). Para o bloqueio de sítios inespecíficos, foi usada solução com soro de cavalo 2,5%, incubando por 20 minutos à temperatura ambiente (Vectastain Kit, Cat. PK-7200, Vector Laboratórios, CA, USA).

As lâminas foram incubadas com o 1° anticorpo: anticorpo Ki-67 (SP6 mAb, Cat. M3064, Spring Bioscience, CA, USA) à concentração de 1:50 (diluído em tampão albumina 1%) por 12 horas (*overnight*) em temperatura de 4 °C. Após o término de incubação do anticorpo, as lâminas foram lavadas com tampão salina fosfato (PBS), pH 7,4 e incubadas com o kit de revelação (Vectastain Kit, Cat. PK-7200, Vector Laboratórios, CA, USA) em temperatura ambiente por 20 min e coradas com solução cromógena (DAB, Peroxidase Substrate Kit, Cat. SK-4100, Vector Laboratórios, CA, USA) por 5 min em temperatura ambiente. Após a incubação, foram lavadas com água destilada e contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

2.8. Processamento para avaliação ultraestrutural

Para a visualização de detalhes ultraestruturais da gengiva, fragmentos de tecido do paciente foram submetidos ao processamento para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tanto, as amostras colhidas durante a biópsia foram imediatamente seccionadas em aproximadamente 1 mm³ e colocadas em tubos de 1,5 ml do tipo “ependorf” contendo aproximadamente 1 mL de solução fixadora de Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose, 0,5mM de cloreto de cálcio e 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2), mantidas por doze horas a 4 °C. Posteriormente, foram realizadas lavagens com 0,1M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2). A etapa de pós-fixação foi realizada com a adição de tetróxido de ósmio 1% 1:1 (v/v) à solução de ferricianeto de potássio 0,08% e cloreto de cálcio 5 mM, diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por uma hora e mantendo as amostras protegidas da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por dez minutos e submetidas à contrastação “*in block*” com solução aquosa de acetato de uranila 0,5% durante duas horas. Em seguida, o material foi lavado com água destilada. O processo de desidratação foi iniciado em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% quinze minutos cada e três banhos de acetona 100%, dez minutos cada).

Após a desidratação, as amostras foram infiltradas com mistura crescente de resina Spurr[®] e decrescente de acetona iniciando a mistura na proporção (acetona:resina) em 2:1, 1:1, 1:2 e resina pura. Cada infiltração durou de doze a vinte horas sendo a última infiltração feita com a resina Spurr[®] pura, durante seis horas. Em seguida, as amostras foram incluídas em fôrmas apropriadas de silicone, contendo resina Spurr[®] pura. O material foi mantido em estufa a 57 °C, por aproximadamente setenta e duas horas para polimerização da resina.

O material foi seccionado em ultra-micrótomo Leica EM UC7[®], utilizando-se navalhas de vidro para obtenção de cortes semi-finos (2-5 µm de espessura) e navalha de diamante para cortes ultrafinos (80-100 nm). Os cortes ultrafinos foram coletados em telas de cobre de 300 *mesh* e contrastados com acetato de uranila 3% diluído em água destilada durante trinta minutos e em solução de citrato de chumbo saturado por dez minutos e em seguida lavados em água destilada. O material foi analisado em Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo Jeol[®] 1011C e a captura de imagens feita pela câmera Gatan Digital Micrograph TM 3.11.0 Copyright[©].

2.9. Processamento para análise molecular

2.9.1. Extração do DNA

Para melhor compreender as bases moleculares dessa síndrome, foi utilizada como estratégia de análise a avaliação citogenética molecular e o sequenciamento genético. O DNA do paciente foi extraído a partir do sangue periférico pelo método *Puregene* “*Salting out*” (Miller et al., 1988). O DNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) e verificada a pureza através da razão das absorbâncias dos comprimentos de ondas de 280/260 nm que ficou entre 1,7 a 2,0.

2.9.2. Sequenciamento de nova geração – exoma

Como estratégia de busca da variante causativa das manifestações patológicas do paciente, foi feita a análise do exoma. Dessa forma é possível comparar as sequências do indivíduo afetado com bancos de dados e as sequências de seus genitores em buscando variantes patogênicas. O DNA do paciente e de seus genitores foram enviados para a empresa *Macrogen Inc.* a fim de realizar o exoma. As bibliotecas de sequenciamento foram preparadas utilizando-se o kit *SureSelect Human All Exon V6 (Agilent Technologies)* e sequenciadas pela plataforma *Illumina HiSeq 4000* com cobertura média de 50 vezes e comprimento de leitura de 2 x 100 pb.

2.9.3. Análise do exoma

As análises de variantes foram realizadas a partir dos arquivos (*Annotated Variant List*) em formato (*_SNP_indel_ANNO) obtido através do pipeline utilizado pela a *Macrogen*. Para a análise das variantes foram estabelecidas estratégias de filtragem e priorização para os 3 modelos de herança mendeliana: autossômica dominante, recessiva e ligada ao cromossomo X. O segundo filtro sobre o efeito da mutação deixando restrito apenas para o modo: *missense; nonsensse; frameshif e splicing*. O terceiro filtro, exclusão de erro de leitura ou alinhamento ou sequencias com baixa cobertura e variantes em genes altamente polimórficos como exemplo receptores olfativos O quarto filtro foi a definição de mutações patogênicas em programas de predição *in silico* restringindo apenas aquelas variantes que foram classificadas como possivelmente patogênicas. O quinto filtro foi inserido com as características fenotípicas do paciente.

2.10. Confirmação da mutação avaliada pelo sequenciamento Sanger

2.10.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) Sanger confirmatório

O DNA genômico extraído das amostras de sangue periférico dos genitores e do paciente foi utilizado para amplificação do gene candidato - *ENPP5* (6p21.1) usando primers iniciadores com a sequência de referência do gene da base de dados ENSEMBL (HGNC:13717), transcrito [ENST00000371383.2](#), disponível no sítio:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000112796;r=6:46159187-46170971;t=ENST00000371383>

Os primers foram desenhados utilizando o programa Exoprimer do Centro Helmholtz disponível no sítio: <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>. Para a reação de amplificação, foi utilizado o par de iniciadores descrito na (Tabela 4) nas reações de PCR em um volume final de 50 µL contendo: 100 ng do DNA molde, 0,4mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão de reação e sulfato de magnésio, dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, 2 unidades (U) de Taq Platinum DNA Polimerase; Tampão fosfato 1x e H₂O Milli-Q qsp, resultando em um volume final de 50 µl.

As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti™ (Thermo Fisher), no laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, baseado no processo de PCR touchdown, que é constituído dos seguintes passos: desnaturação a 95 °C por 5 min; seguido por 20 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95 °C, anelamento a 60 °C por 30 segundos com queda de 0,5 °C a cada ciclo e extensão a 72 °C por 30 segundos; em seguida 16 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95 °C, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos; e por fim, 10 min de extensão final a 72 °C.

Para confirmação da amplificação dos fragmentos de interesse, os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e fotografados.

Tabela 4. Sequência dos iniciadores para o gene *ENPP5*, para a amplificação do DNA pela técnica de PCR.

Gene	Sequência 5'----- 3'	Tamanho do amplicon
<i>ENPP5</i>	Direto GCTGCACTGAGTCTTTCAACC	225 pb
	Reverso ATTCTCTGCAAAGAGGCCAG	

2.11. Confirmação da variante avaliada pelo sequenciamento Sanger

O produto obtido da amplificação descrita no item 2.10.1 foi purificado por meio do sistema enzimático “EXOSAP-IT” (Thermo Fisher) para retirada do excesso de dNTPs e iniciadores presentes no produto final da PCR. Num volume de 7 µl do produto de PCR, foram acrescentados 2 µL do mix do kit de purificação, incubado a 37 °C por 30 min e, após transcorrido esse tempo, a enzima foi inativada a 80 °C por 15 min. A purificação dos produtos foi confirmada no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific), cuja concentração dos produtos das amplificações variaram entre 440 ng/µL e 455 ng/µL com pureza de 1,9. A reação de sequenciamento utilizou o kit BigDye Terminator (BDT) v 3.1 (Thermo Fisher) com volume final de reação de 10 µL em singleplex para cada iniciador contendo: 2 µL do produto de amplificação diluído de acordo com as orientações do fabricante; 4 µL do *primer* (Direto ou Reverso) a 3,2 pmol/µL; 1µL do BDT 3.1; 1,75 µL de tampão de sequenciamento 5x e H₂O livre de nucleases qsp. Para o gene *ENPP5*, a reação de sequenciamento consistiu no seguinte ciclo: desnaturação inicial a 96 °C por 1 min seguida de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15s, anelamento a 56 °C por 15s, e extensão a 60 °C por 4 min e manutenção em 4 °C até a retirada do produto de reação. Em seguida, o produto foi precipitado pelo método de Etanol-EDTA de acordo com as orientações do fabricante, seguida da aplicação do produto final em placa para leitura no sequenciador ABI3130.

3. RESULTADOS

3.1. Relato de Caso

Paciente do sexo masculino com história de consanguinidade na família (Figura 5), nascido a termo com 3.900 g e 50 cm. Ao nascimento foi notada criptorquidia bilateral sem outras alterações morfológicas. A mãe relatou que por volta de 1 ano de idade iniciou quadro de crises convulsivas com múltiplos episódios durante o dia. Aos 4 anos iniciou a vida escolar, período no qual foi detectada a deficiência intelectual. Atualmente o paciente tem 20 anos, não foi alfabetizado e não frequenta a escola, mantém sob controle as crises convulsivas desde 2012. Aos 13 anos de idade, foi encaminhado para a Clínica de Atendimento de Pacientes Portadores de Anomalias Dentárias, na Unidade de Saúde Bucal no Hospital Universitário de Brasília-HUB, devido ao crescimento anormal do complexo maxilomandibular e hiperplasia gengival que se iniciou por ocasião da troca da dentição decídua para a permanente.

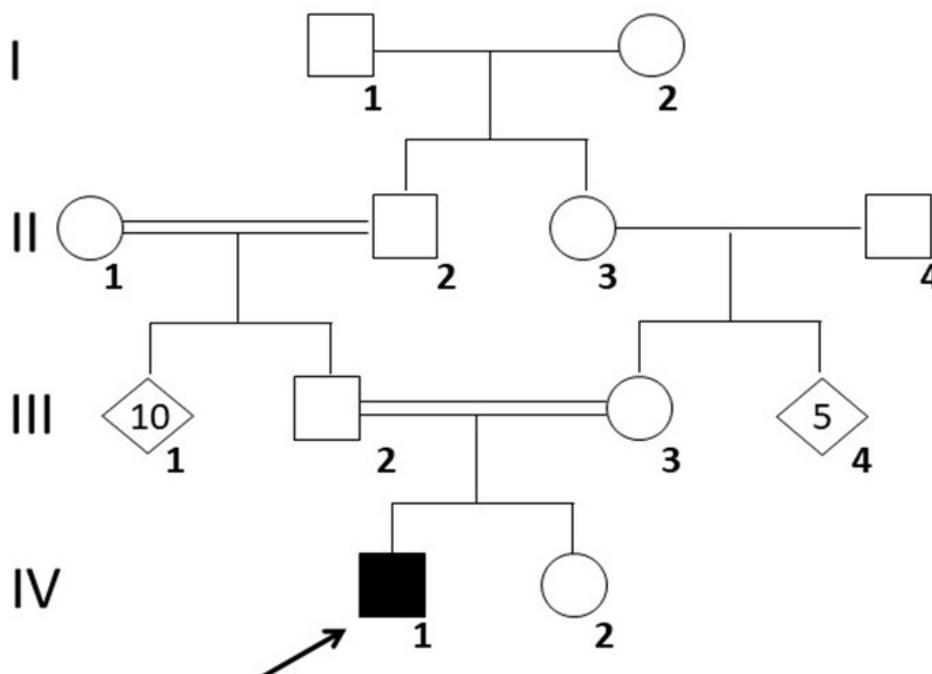


Figura 5. Heredograma mostrando a consanguinidade familiar. A seta indica o caso índice.

O paciente refere dificuldade para se alimentar e realizar higiene bucal. O exame físico mostrou macrocefalia, testa reta e alta, sobrancelhas arqueadas, hipertelorismo, fendas palpebrais oblíquas para cima, nariz relativamente pequeno e narinas antevertidas além das alterações bucais (Figuras 6 e 7).

As alterações craniofaciais mais marcantes estão presentes na arcada dentária superior, com protrusão da pré-maxila e incisivos superiores com diastema, má oclusão dentária, palato ogival e hiperplasia gengival (Figuras 6 e 7). O paciente também apresenta cifoescoliose, múltiplos nevus em axilas, membros superiores alongados, adiposidade abdominal, hipoplasia da bolsa escrotal, presença de culote na região do quadril, rotação das articulações dos membros inferiores, *genu valgum* e *halux valgum*. Relatada queixa de dor crônica em membros e infecções respiratórias de repetição. Faz uso contínuo de ácido valproico - Depakene® e carbamazepina - Trileptal®. As alterações clínicas do paciente índice estão resumidas na Tabela 6 abaixo.



Figura 6. Caracterização fenotípica do caso índice mostrando as manifestações clínicas e evolução no período de 2013 e 2019.

3.2. Exame clínico odontológico

O paciente foi submetido à anamnese, exame físico intra e extrabucal e exame radiográfico (panorâmica, periapicais e interproximais), tomografia computadorizada com feixe cônico e fotografias extra e intrabucais.

Ao exame físico intrabucal foram observados pré-maxila proeminente e protrusão dos incisivos centrais superiores com hiperplasia gengival generalizada. À análise radiográfica e tomográfica foi possível identificar a retenção de segundo pré-molar inferior esquerdo, dos segundos e terceiros molares superiores e inferiores (18, 28, 38, 37, 35, 47 e 48) sendo os dentes 37 e 47 com inserção óssea profunda, em posições verticalizadas e com os ápices radiculares próximos à base da mandíbula. Os terceiros molares estão mesioangulados (Figura 7A-D). O exame tomográfico da face permitiu observar a presença de hipercementose em todos os dentes, de forma mais acentuada nos dentes anteriores superiores, além de destruição coronária extensa nos dentes 45 e 46. Nota-se também permanência prolongada do primeiro e segundo molar decíduo (74, 75). No incisivo central inferior direito (41), observa-se o alargamento da câmara pulpar e canal radicular, assim como alargamento de todo o rebordo alveolar na maxila, com aumento significativo na espessura buco-palatina (Figuras 7 e 8).



Figura 7. Fotografias intrabucais do caso clínico. Nota-se pré-maxila proeminente, hiperplasia gengival, protrusão dos incisivos centrais, diastema e palato ogival (A-C). (D) Radiografia panorâmica. Nota-se atraso na erupção dentária de dentes permanentes, hipercementose em dentes anteriores superiores, indicadas por asteriscos (*).

retenção de dentes decíduos (D) e hipercementose. (E) Imagem tomográfica evidenciando a hipercementose (*).

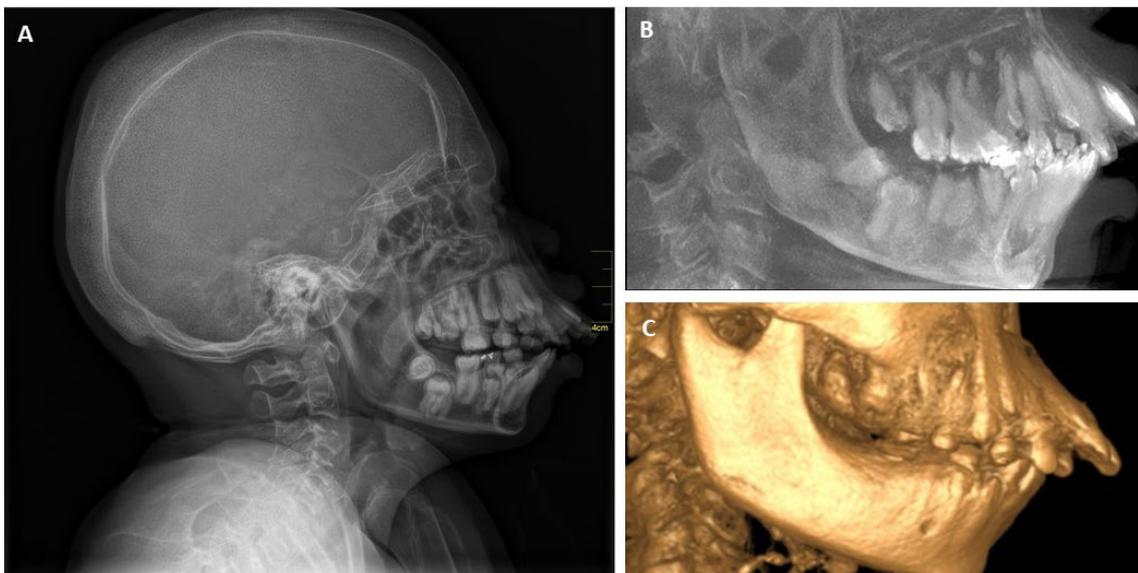


Figura 8. (A) Radiografia de crânio demonstrando o espessamento difuso da díploe e protusão da pré-maxila. (B) Imagem tomográfica do complexo maxilomandibular evidenciando a hipercementose. (C) Reconstrução tridimensional do complexo maxilomandibular. Nota-se a protrusão da pré-maxila.

3.3. Exame clínico radiográfico

Após a avaliação clínica e a caracterização fenotípica do paciente, foi necessária a investigação de alterações esqueléticas, realizada através de estudo radiográfico. O exame radiológico revelou: calvária com espessamento difuso da díploe e do osso frontal (Figura 5).

Úmero com aspecto tubular, alargamento das metáfises proximais e afilamento da cortical óssea. Falanges apresentando afilamento da cortical óssea, alargamento dos metacarpos com epífises distais em formato de cone. Coluna com aumento de radioluscência óssea, esclerose das superfícies superiores e inferiores dos corpos vertebrais. Fêmures apresentando região metafisária distal alargada e afilamento da cortical óssea. Aumento difuso da radioluscência óssea em todos os ossos do esqueleto apendicular (Figuras 6 e 7). À avaliação da ultrassonografia abdominal observou-se hepatomegalia moderada e esteatose hepática (moderado grau II) (dado não apresentado).

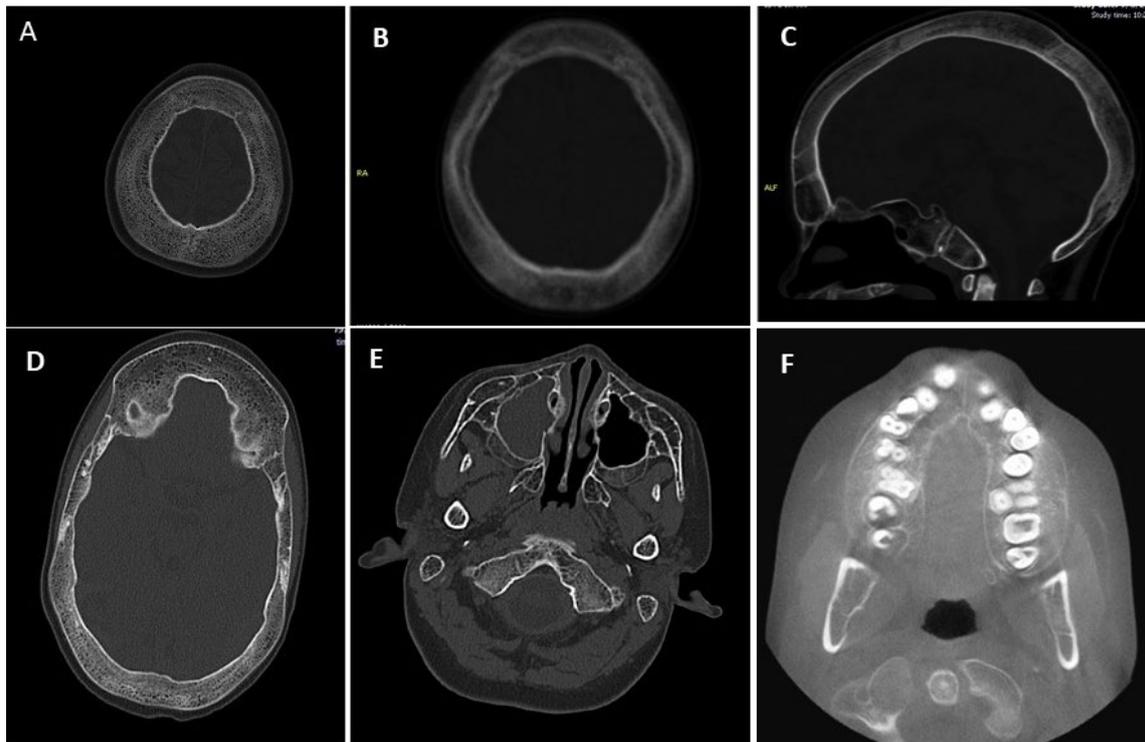


Figura 9. Tomografia computadorizada de crânio mostrando o espessamento difuso da cúpula da calota craniana e da base do crânio (A-D). Observa-se o alargamento de todo o rebordo alveolar na maxila com aumento significativo na espessura buco-palatina (D e F).

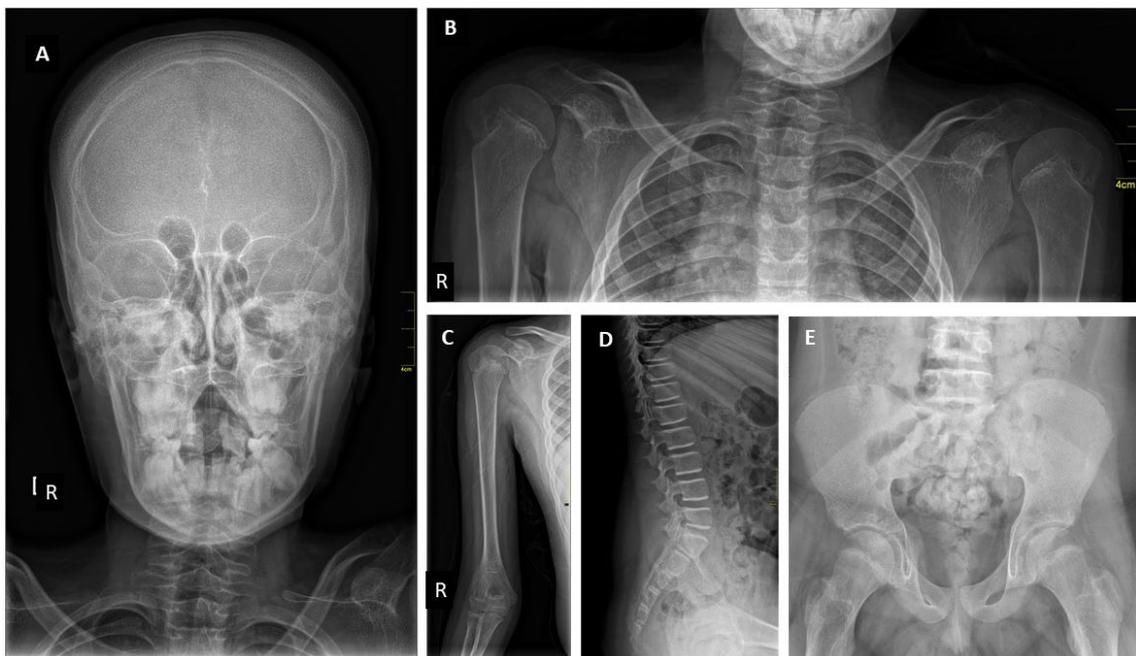


Figura 10. Avaliação radiográfica. (A) Crânio com espessamento dos ossos. (B) Região da cintura escapular evidenciando a diminuição da densidade mineral óssea no úmero e clavícula. (C) Úmero com alargamento da metáfise proximal. (D) Perfil da coluna lombar

e do terço distal da coluna torácica apresentando redução difusa da densidade mineral óssea e esclerose das superfícies superiores e inferiores dos corpos vertebrais visualizados. (E) Região da cintura pélvica com pelve e fêmures apresentando redução da densidade mineral óssea. Fêmures apresentando alargamento na região metafisária.



Figura 11. Exame radiográfico mostrando (A) alargamento da região metadiafisária proximal do rádio e ulna com diminuição da densidade óssea. (B) Afilamento da cortical óssea do metacarpo e falanges. (C-D) Alargamento das regiões metadiafisária distal dos fêmures e proximal das tíbias e fíbulas. (F) Pé com o primeiro metatarso alargado. As

imagens radiográficas dos membros superiores e inferiores relevam redução importante da densidade mineral óssea.

3.4. Exames clínicos laboratoriais

Os primeiros exames laboratoriais foram realizados após consulta ambulatorial com a equipe da genética do Hospital Sarah Kubitschek, com fins de investigação da hipótese diagnóstica. O segundo e terceiro exames foram realizados no ambulatório do HUB para avaliação pré-anestésica, em virtude de programação de procedimento cirúrgico na gengiva (Tabela 5). Alguns exames bioquímicos não foram repetidos ao longo da investigação diagnóstica por serem considerados como dados de exclusão diagnóstica concluída, como por exemplo, a mensuração de cloro no suor, a fim de descartar a hipótese de fibrose cística. O parâmetro para erro de triagem do metabolismo também não foi repetido por se tratar de dado de exclusão diagnóstica para síndromes genéticas metabólicas. Portanto, apenas os parâmetros que apresentaram alterações em relação aos valores de referência são exibidos na (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados de exames bioquímicos laboratoriais avaliados a partir da coleta de sangue periférico do paciente em três diferentes datas.

Exame	11/07/2017	12/04/2019	10/12/2019	Referência*
Glicose (mg/100mL)	82	101	95	70 - 99
Cálcio (mg/100mL)	10,6	10,3	10,5	8,5 - 10,4
Fósforo (mg/100mL)	4,2	4,2	5,3	2,3 - 4,5
Magnésio (mg/100mL)	1,9	NR	2,2	2,04 - 2,64
Osteocalcina (ng/mL)	99,5	NR	NR	24 - 70
PTH sérico (pg/mL)	90,2	70,29	36,88	10 - 69
ALT (U/L)	NR	8	8	10 - 49
FSH (mUI/mL)	NR	NR	0,113	1,5 - 12,4
LH (mUI/mL)	NR	NR	< 0,1	1,7 - 8,6
Prolactina (ng/mL)	NR	30,86	10,58	4,04 - 15,2
Testosterona (ng/100mL)	NR	993,7	57,15	> 245

*De acordo com Möller et al. (2002). Legenda: NR – Não realizado.

Tabela 6. Resumo da caracterização clínica do paciente índice.

Região	Características clínicas
Cabeça	Macrocefalia, hiperostose da calota craniana, testa reta, sobrancelhas escavadas, hipertelorismo, fendas palpebrais oblíquas para cima, nariz pequeno e narinas antevértidas.
Boca	Prognatismo, palato estreito, hiperplasia gengival, protrusão de pré-maxila, incisivos frontais superiores protrusos e com diastema, má oclusão dentária, atraso na erupção dos dentes, hipercementose.
Esqueleto	Osteopenia em membros superiores, inferiores e corpos vertebrais, cifoescoliose, <i>genus valgum</i> , <i>halux valgum</i> . Em ossos longos, alargamento da região metafisária distal e afinamento da cortical óssea.
Avaliação bioquímica	Aumento do fósforo, osteocalcina, PTH sérico, glicose e prolactina. Redução da dosagem de testosterona, LH, FSH, ALT e Magnésio. Cálcio sérico esteve próximo ou dentro do valor de referência em todas as mensurações.
Outros	Deficiência intelectual, convulsão, adiposidade abdominal, hipoplasia da bolsa escrotal, criptorquidia bilateral, presença de culote na região do quadril, hipogonadismo normogonadotrófico, hipotireoidismo e infecções respiratórias de repetição.

3.5. Resultados da avaliação celular

3.5.1. Caracterização das culturas primárias gengivais

As células utilizadas nesta pesquisa foram obtidas a partir de fragmentos de gengiva do paciente e de indivíduos saudáveis representando o grupo controle. Foram utilizadas linhagens de células recém congeladas de 3 indivíduos do sexo masculino com idade próxima à do paciente com o intuito de manter a padronização e os critérios de análise. Sob as mesmas condições de cultivo, as linhagens de células dos controles demoraram em média 2 semanas para ter a confluência necessária para a avaliação dos

ensaios de viabilidade celular enquanto, a linhagem celular do paciente necessitou de mais de 3 semanas para atingir a confluência ideal para a realização dos experimentos após o descongelamento.

No início do crescimento celular de ambas as linhagens (controles e paciente), as células apresentaram morfologia arredondada e, com o avanço da proliferação, foram assumindo características fusiformes em arranjos paralelos compatíveis com a morfologia de fibroblastos, ocasião em que atingiram a confluência na placa de cultivo (Figura 12).

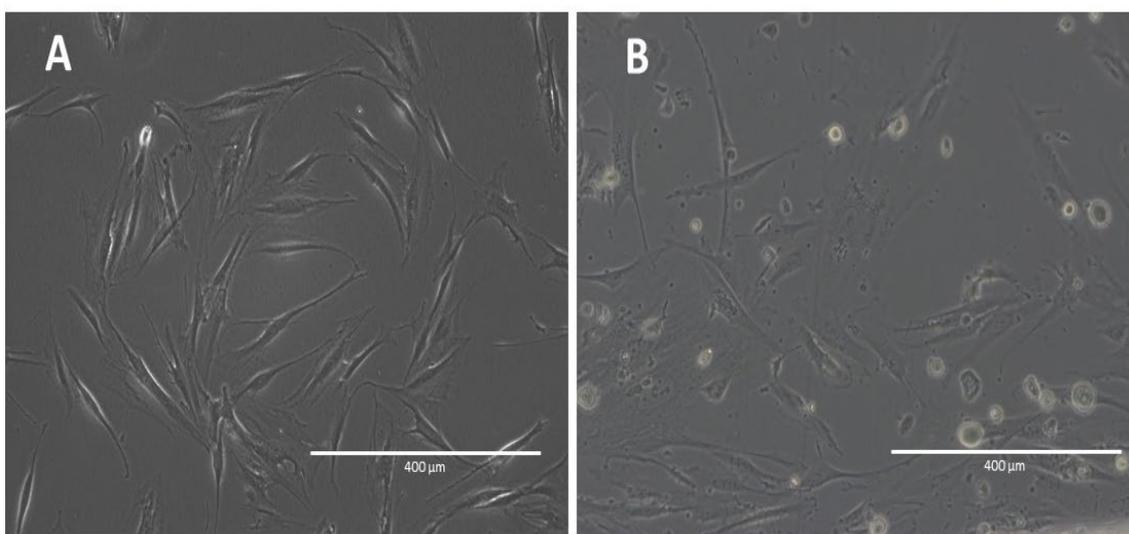


Figura 12. Crescimento dos fibroblastos do paciente e indivíduo controle a partir de fragmento de gengiva (técnica explante). (A) Células do indivíduo controle após 2 semanas de cultivo. (B) Células do paciente após 5 semana de crescimento em cultivo.

A análise da morfologia foi detalhada por meio da técnica de imunofluorescência, a qual permite identificar o núcleo das células corado em azul pelo o DAPI. À avaliação pela microscopia de fluorescência foi possível observar diferenças entre as células do grupo controle e do paciente para os seguintes parâmetros: tamanho, perímetro e área núcleos (Tabela 7).

Todas as linhagens das populações celulares dos indivíduos controlem e do paciente apresentaram morfologia típica de fibroblastos: células fusiformes, longos processos citoplasmáticos e núcleo ovalado. As células do paciente aparentaram ser maiores que as dos controles (Figura 13).

Tabela 7: Parâmetros avaliados pelas imagens de microscopia de imunofluorescência dos indivíduos do grupo controle e do paciente.

Parâmetros	Grupo controle		Paciente		Valor de p
	Média	DP	Média	DP	
Área do Núcleo (UA)	51.753,8	22.779,9	31.442,7	10.135,7	<0,0001
Tamanho Médio (UA)	1.256,8	359,8	2.294,5	579,2	<0,0001
Perímetro (UA)	151,1	21,85	229,9	30,02	<0,0001
Quantidade (un./campo)	43,58	21,26	14,04	4,25	<0,0001

Legenda: UA – Unidades arbitrárias. DP – Desvio padrão.

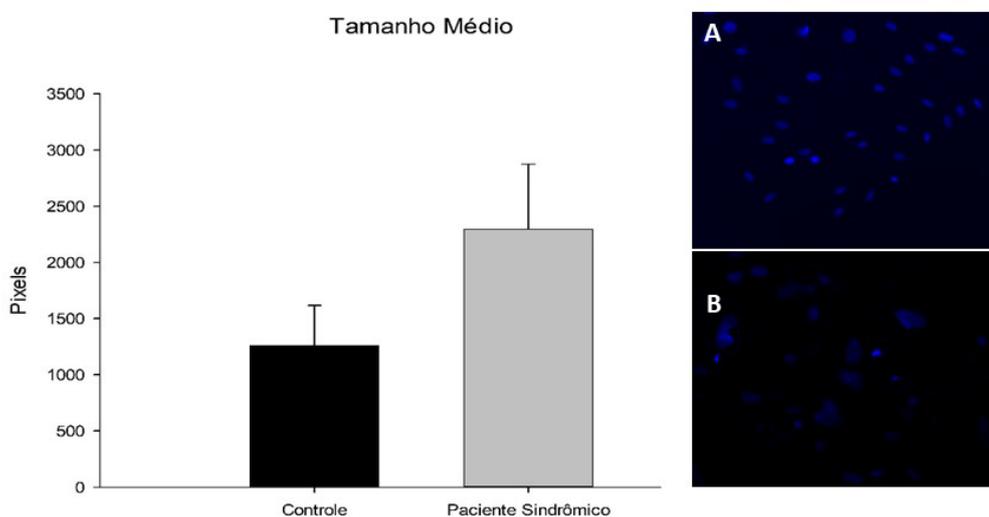


Figura 13. Representação gráfica da comparação morfológica após a medida dos núcleos das células de fibroblastos de indivíduos controle (preto) e do paciente (cinza). As imagens A e B representam avaliação morfológica pela técnica de imunofluorescência. Em (A) cultura de fibroblastos de indivíduos controle e em (B) cultura de fibroblasto do paciente. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS[®] (v9.3, Cary, North Carolina) usando o teste T.

3.6. Resultados da avaliação da viabilidade celular

No ensaio de MTT, foi observado que os valores de absorvância das células do grupo controle e do paciente não apresentaram diferenças significativas, indicando que a viabilidade celular foi semelhante em todos os 4 períodos de crescimento. A Figura 14 abaixo exibe a curva de viabilidade obtida neste ensaio.

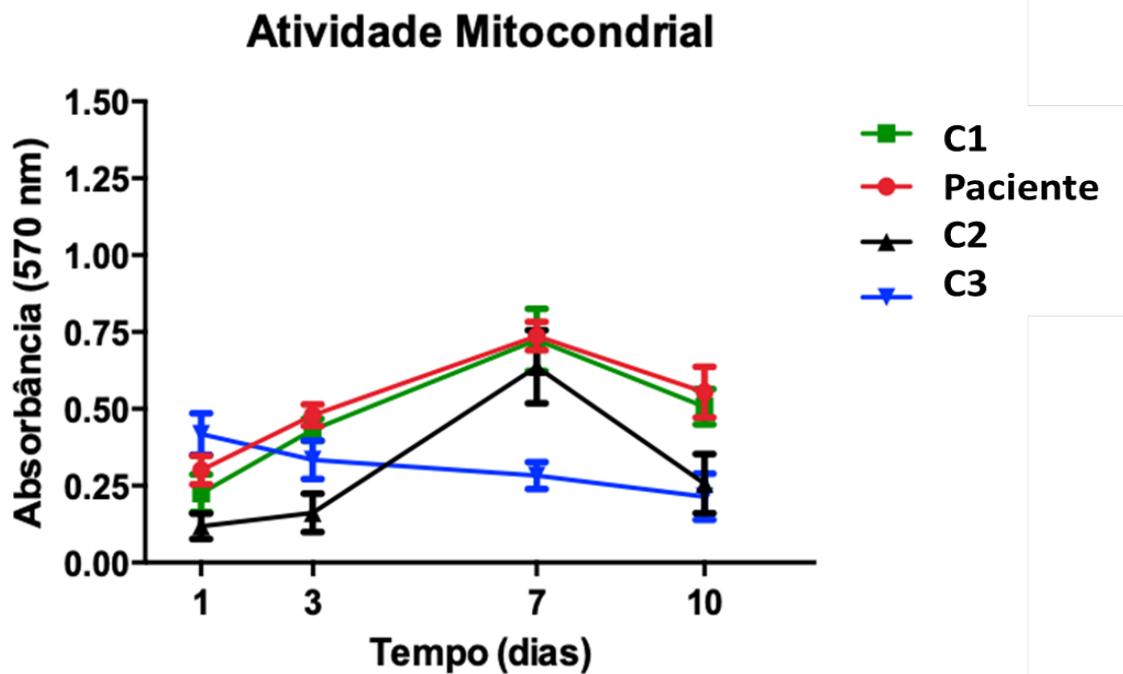


Figura 14. Curva de viabilidade celular dos pacientes controle (verde, preto e azul) representando linhagem de células de 3 indivíduos sem síndrome e das células do paciente em vermelho. O gráfico foi construído a partir dos valores de absorvância nos tempos de 1, 3, 7 e 10 dias de crescimento. Não houve diferença significativa para a viabilidade celular entre o grupo dos indivíduos controle e o paciente ($p > 0.05$).

3.7. Resultado da análise histopatológica

Os fragmentos de gengivas coletados do paciente apresentaram características macroscópicas dentro do padrão da normalidade, com superfície simétrica, limites precisos e coloração usual. A consistência do tecido era firme e elástica. Cortes histológicos da gengiva, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), apresentaram epitélio pavimentoso estratificado com acantose irregular e alongamento das cristas (Figura 15 A-C). A porção superficial da lâmina própria mostrou fibras de colágeno em arranjos perpendiculares ao epitélio de revestimento. Na porção reticular, as fibras

estavam paralelamente dispostas, formando longos e grossos feixes. Algumas fibras encontravam-se hialinizadas e associadas à presença de fibras elásticas (Figura 15 B). Em meio às fibras colágenas, notou-se fibroblastos, com aspecto fusiforme e por vezes estrelados. A lâmina própria profunda, ainda, mostrou áreas mixóides e infiltrado inflamatório perivascular e, em áreas intersticiais, houve predomínio de plasmócitos (Figura 15 C). Os vasos sanguíneos apresentaram-se, por vezes, extasiados.

Os tecidos gengivais, quando corados pela técnica de *Tricrômico de Masson e Verhoeff*, permitiram facilmente observar o maior predomínio de fibras elásticas na porção reticular. Essas fibras, por sua vez, formavam prolongamentos longos, densos e paralelos, entremeadas por fibras colágenas. Quando analisada a porção submucosa, predominaram feixes finos, paralelos e dispersos de fibras colágenas em meio às estruturas de vasos sanguíneos e focos de infiltrado inflamatório (Figura 15 D-I).

3.8. Resultado da avaliação imunohistoquímica

A marcação com o anticorpo Ki-67, tem por objetivo mostrar o quanto as células estão proliferando, ou seja, em divisão celular. A análise da gengiva apresentou resultado compatível à fisiologia do tecido gengival. A porção epitelial apresentou marcação fortemente positiva em virtude de possuir células epiteliais que passam por intenso processo de renovação tecidual, e com isso, a proliferação nessa região é normalmente maior. Nas porções reticular e submucosa, o índice de proliferação foi de 5%, apresentando discreta marcação pelo anticorpo em virtude de ter poucas células em divisão (Figura 15 J-L).

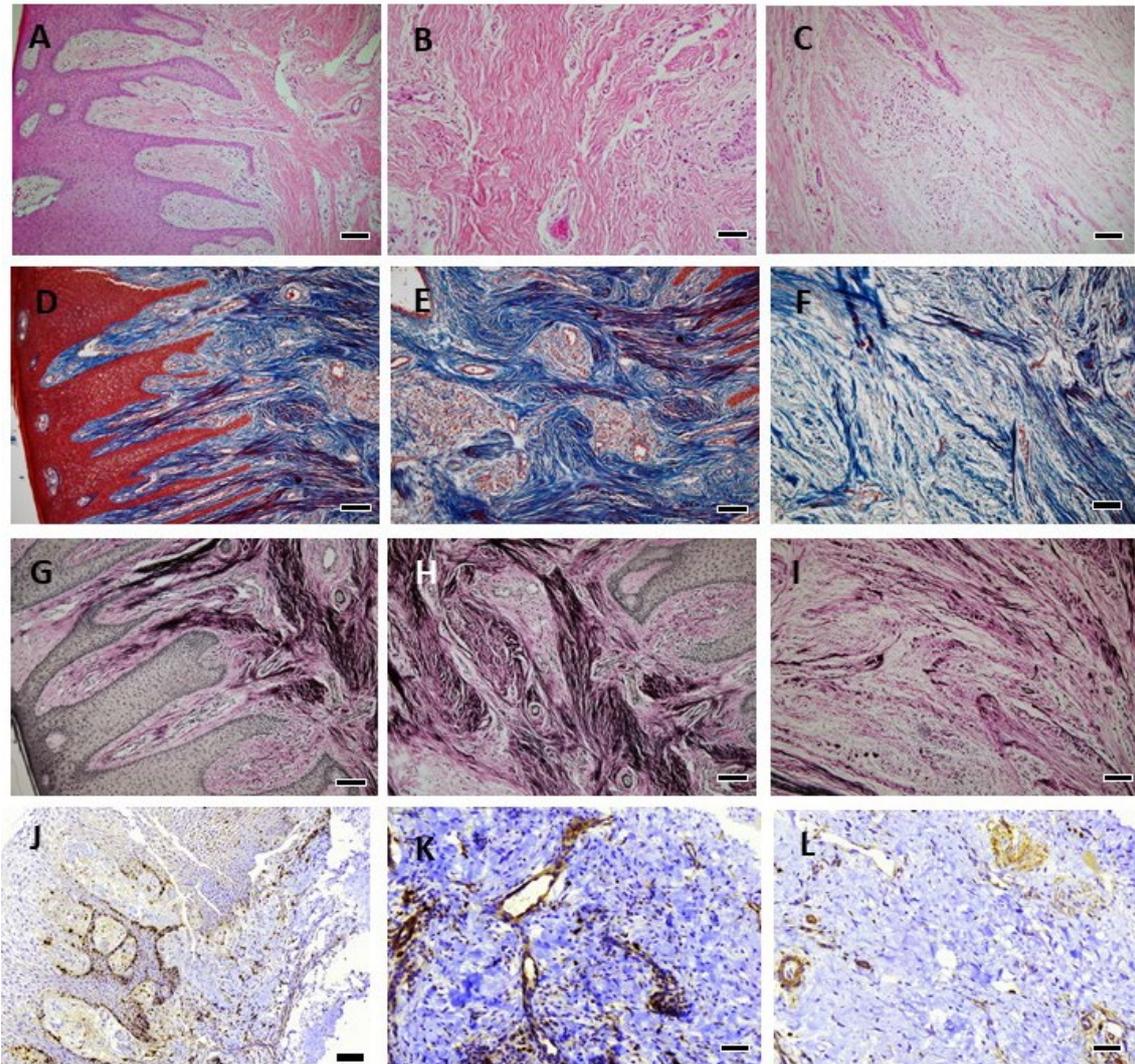


Figura 15. Análise histopatológica de tecido gengival. (A-C) tecido corado com H&E mostra epitélio escamoso estratificado com cristas proeminentes e alongadas. Tecido conjuntivo denso formado por longos feixes paralelos de fibras. (D-F) Cortes corados com Tricômoro de Masson corando as fibras colágenas. (G-I) Coloração de Verhoff evidenciou a presença das densas fibras elásticas, dispostas paralelamente entre si. (J-L) Imunomarcacão com anticorpo para Ki-67, revelando a porção epitelial com proliferaçao de células e a região reticular da gengiva com fibroblastos e células endoteliais marcadas positivamente pelo anticorpo. Barra 100 μ m.

3.9. Resultado da análise ultraestrutural

A análise ultraestrutural da gengiva pela microscopia eletrônica de transmissão revelou, na porção epitelial, queratinócitos com ultraestrutura compatível com a normalidade, representada por células com morfologia regular, arredondadas, núcleo

ocupando grande área da célula e nucléolo visível. O citoplasma continha organelas típicas e a membrana apresentou abundantes junções celulares. O tecido conjuntivo estava representado por fibroblastos com longos prolongamentos citoplasmáticos, uma matriz fibrosa com áreas de material amorfo e eventuais áreas de infiltrado inflamatório. Os fibroblastos em sua maioria estavam com morfologia alongada, processos citoplasmáticos longos e finos, áreas de dilatação de retículo endoplasmático e formação de vesículas, sugerindo atividade de síntese celular. O núcleo foi visível com cromatina homogênea e nucléolo pouco evidente. Em meio aos fibroblastos foi observada matriz formada por densos feixes paralelos, por vezes associados a conteúdo amorfo (Figura 16 A e B). Os feixes eram formados por fibrilas colágenas e elásticas (Figura 16 C). Em áreas com secções longitudinais e transversais, foi observado que as fibrilas colágenas não apresentaram alterações ultraestruturais.

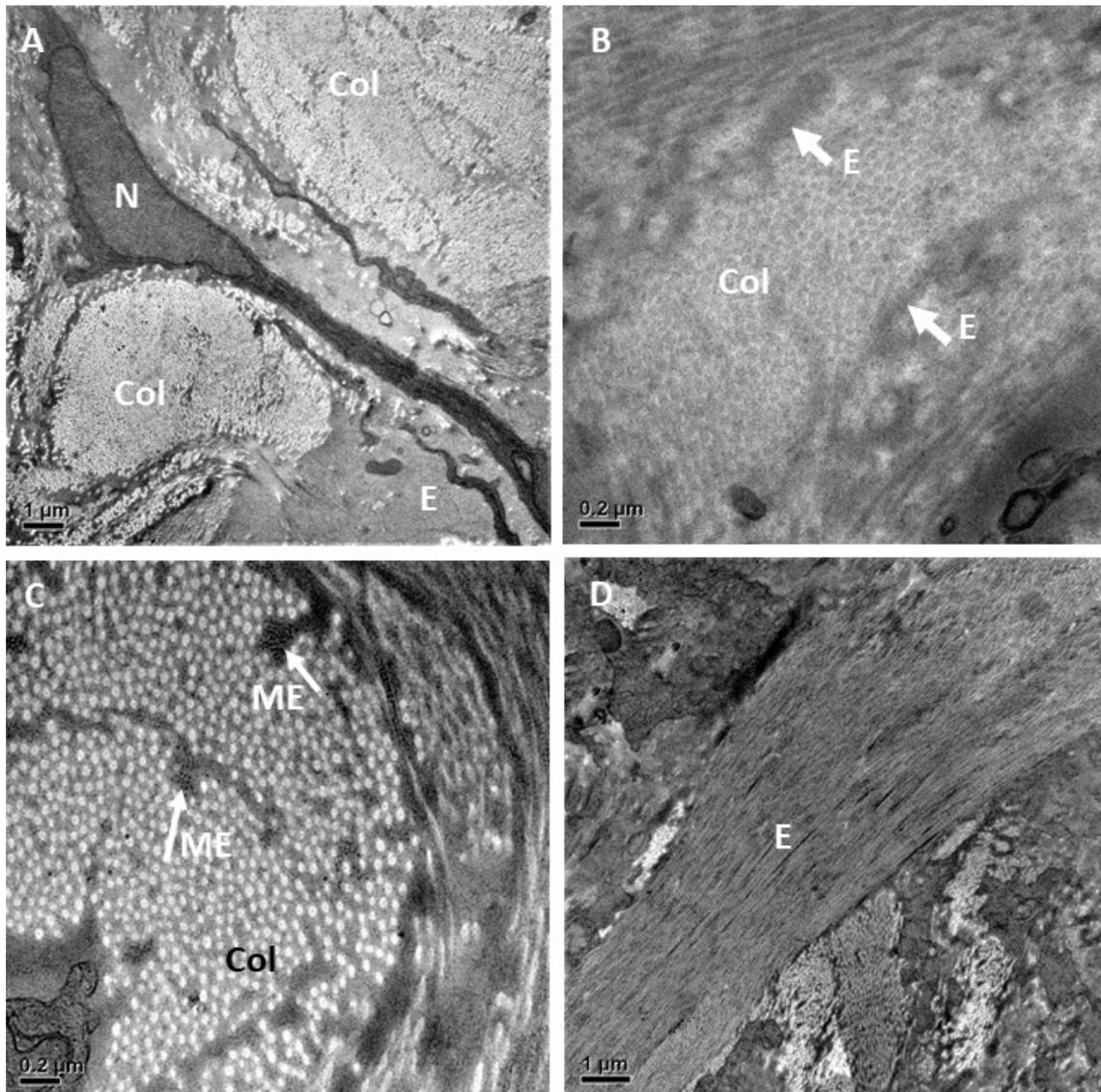


Figura 16. Micrografia ultraestrutural da gengiva. (A) Fibroblasto mostrando núcleo e longos prolongamentos citoplasmáticos em meio a uma matriz colágena. (B-C) Avaliação transversal de fibrilas colágenas associadas às fibras elásticas. (D) Avaliação longitudinal dos feixes densos e paralelos de elastina. Abreviaturas: (N) núcleo; (Col) fibrila colágena; (ME) microfibrila elástica; (E) elastina.

3.10. Resultados da avaliação molecular

3.10.1. Análise dos dados de exoma

As análises das variantes gênicas foram realizadas a partir dos arquivos *Annotated Variant List* em formato *_SNP_indel_ANNO obtido através de análise bioinformática realizada na Macrogen, Coreia. O resultado do exoma do paciente apresentou 103.567 variantes diferentes em comparação ao DNA de referência (hg19 de UCSC original GRCh37 de NCBI, Feb.2009). Para a análise das variantes foram estabelecidas estratégias de filtragem e priorização para os 3 modelos de herança mendeliana: autossômica dominante, recessiva e ligada ao cromossomo X. Apesar da história do paciente favorecer o modelo de herança recessiva, optou-se por realizar as três análises por se tratar de uma condição rara, isolada e sem relatos prévios na literatura.

A filtragem dos dados teve por etapa inicial a escolha da zigosidade, definindo o modo de herança. Homozigose para modelo de herança recessiva, hemizigose para a herança ligada ao cromossomo X e heterozigose para o modelo de herança dominante. Em seguida, foi excluído o cromossomo X para o modo de herança autossômica (dominante e recessivo). Já para o modelo de herança ligada ao X, todos os autossomos foram excluídos e a análise só aconteceu no cromossomo X.

O próximo passo foi a definição do tipo da variante, deixando restrito aos modelos *missense; nonsensse; frameshife splicing*. Feito isso, foi selecionado o modo de cobertura adotando apenas variantes que tiveram leituras maior ou igual a 50. Outro critério adotado foi a definição do filtro de variantes patogênicas em programa de predição *in silico*, permanecendo apenas aquelas classificadas como possivelmente patogênicas (*Sift, Polyphen 2 e Mutation Taster*).

Ao final, foram excluídas variantes em genes altamente polimórficos como receptores olfativos, por exemplo, e múltiplas variantes descritas em um pequeno trecho de DNA caracterizando possível erro de leitura ou alinhamento (Tabela 8). A filtragem resultou em variantes em 8 genes candidatos para o modo de herança autossômica recessiva (Tabela 9); 25 genes candidatos para o modo de herança autossômica dominante (Tabela 10) e 12 genes candidatos para o modo de herança ligado ao cromossomo X (Tabela 11). A partir desse resultado, estudo individual de cada um dos genes candidatos foi realizado em bases e banco de dados (Pubmed, *Genecards, GeneBrowser* e OMIM) a fim de priorizar os genes mais prováveis na causa do quadro clínico.

Após essa análise, destacou-se a variante no gene *ENPP5* como a mais provável causadora de doença. A hipótese de que esse gene seja o responsável pela patogênese dessa nova displasia esquelética deve-se ao fato de que, no modelo de herança recessiva, foi a única variante com predição patogênica e pelo seu papel já conhecido no metabolismo ósseo. O *ENPP5* faz parte de uma família de enzimas, endonucleases pirofosfatases/fosfodiesterases (ENPPs), que participam no metabolismo ósseo. Todas as ENPPs têm participação no controle da hidrólise de pirofosfato inorgânico extracelular.

Tabela 8. Esquema de filtragem dos dados de variantes nas três formas de herança.

Tipo de Herança	Zigozidade	Efeito	Cobertura	Predição <i>in silico</i>	Impacto Putativo	Crítérios Extras de Exclusão
Autossômico Recessivo	Homozigose	<i>Missense</i> <i>Nonsense</i> <i>Frameshift</i> <i>Splice</i>	≥ 50 leituras	Sift, Polyphen e Impacto putativo	Moderado Alto	Erro de leitura
Autossômico Dominante	Heterozigose	<i>Missense</i> <i>Nonsense</i> <i>Frameshift</i> <i>Splice</i>	≥ 50 leituras	Sift, Polyphen e Impacto putativo	Moderado Alto	Erro de leitura, e genes altamente polimórficos
Ligado ao X	Hemizigose	<i>Missense</i> <i>Nonsense</i> <i>Frameshift</i> <i>Splice</i>	≥ 50 leituras	Sift, Polyphen e Impacto putativo	Moderado Alto	Erro de leitura

O gene *ENPP5* está localizado no cromossomo 6 na região 6p11.2-21.1, constituído por 5 éxons e codifica a proteína ENPP5, uma endonuclease pirofosfatase/fosfodiesterase putativa. Essa é uma glicoproteína transmembrana expressa em diferentes tecidos humanos como, na aorta, cólon, coração, paratireoide, próstata e testículo (Bollen et al., 2000). A ENPP5 atua principalmente na quebra de fosfato inorgânico e na hidrólise de ligações fosfodiésteres. No entanto, pouco se sabe sobre as outras funções catalíticas e biológicas dessa proteína (Goding et al., 2003).

Em nossa análise, outra variante em heterozigose, no gene *TMEM53*, foi identificada. Esse gene já é amplamente conhecido como uma das múltiplas causas de deficiência intelectual, podendo ser o responsável pelo comprometimento cognitivo no paciente índice. Contudo, como não há outros relatos de variantes no gene *ENPP5*, não podemos excluir que a própria variante de *ENPP5* cause também a deficiência intelectual

observada. Sabe-se que a proteína ENPP5 atua na comunicação neuronal (Goding et al., 2003) e, por essa razão, não foi excluída neste momento, a ação do gene *ENPP5* como o responsável por todas as manifestações clínicas do paciente, incluindo a deficiência intelectual.

Tabela 9. Genes resultantes da filtragem das variantes em homozigose segundo padrão de herança autossômica recessiva com o resumo das suas respectivas funções.

Gene	Função
<i>ENPP5</i>	Endonuclease pirofostatase/fosfodiesterase que atua na fosforilação de fosfato inorgânico, na hidrólise da molécula de NAD e pode desempenhar papel na comunicação celular neuronal.
<i>MUC3A</i>	Gene da mucina codificada em glicoproteínas epiteliais. Associada à doença inflamatória intestinal.
<i>NIPAL2</i>	Atua no transporte de glicose e outros açúcares, sais biliares, ácidos orgânicos, íons metálicos e amina.
<i>KLHL38</i>	Atua na ubiquitinação de proteínas.
<i>RPGRIP1L</i>	Gene que codifica proteína presente no citoplasma das células ciliadas, relacionada com a causa de duas síndromes: S. Joubert tipo 7 e S. de Meckel tipo 5.
<i>CCDC79</i>	Expresso em núcleo. Codifica proteínas que atuam no reparo e construção dos telômeros.
<i>MLKL</i>	Pertence a superfamília das quinases e atua induzindo aumento do influxo de cálcio intracitoplasmático, causando necrose celular.
<i>SARM1</i>	Gene mitocondrial, associado a degeneração valeriana, regulação dendrítica, envolvimento com as vias do receptor <i>Toll-like</i> e deficiência intelectual.

Tabela 10. Genes resultantes da filtragem das variantes segundo padrão de herança autossômica dominante, com o resumo das suas respectivas funções.

Gene	Funções
<i>TMEM53</i>	Codifica proteína transmembrana e é superexpresso no fígado além de atuar na inibição do ciclo celular.
<i>OBSCN</i>	Calmodulina citoesquelética que interage na estruturação dos músculos estriados e desempenha papel na miofibrinogênese. Pode mediar as interações entre o retículo sarcoplasmático e miofibrilas. Associado a cardiomiopatia.
<i>C3orf56</i>	Expresso em célula progenitoras e, na fase adulta, é encontrado em ovário e testículos.
<i>EFCC1</i>	Ligante de íon cálcio com superexpressão no pulmão e ovário. Função ainda desconhecida.
<i>ARAP2</i>	Proteína ativadora de GTPase. Modula a remodelação do citoesqueleto de actina, regulando os membros da família IRA e RHO.
<i>SRD5A1</i>	Esteróide que catalisa a conversão da testosterona em di-hidrotestosterona (DHT). Associado à hipospádia familiar e ovário policístico.
<i>NIPBL</i>	Atua no carregamento do complexo coesina no DNA. Associado à Síndrome Cornélia de Lange, tetralogia de Fallot e fenda palatina.
<i>BLOC1S5</i>	Atua na biogênese de lisossomo e no direcionamento de proteínas de membrana para as terminações nervosas.
<i>FLNC</i>	Função na ligação cruzada (<i>cross-link</i>) e reorganização do citoesqueleto de actina. Pode ter função na linha Z de células musculares. Associado à cardiomiopatia.
<i>LOC93432</i>	Atividade catalítica, ligante de carboidrato.
<i>GPRIN2</i>	Possível envolvimento no crescimento de neurites.
<i>NKX1-2</i>	Possível envolvimento na especificação celular, particularmente no SNC.
<i>TAS2R19</i>	Atua na percepção gustativa do sabor amargo.
<i>GXYLT1</i>	Atua na modificação do resíduo de xilose no fator de crescimento epidermal. Também atua no domínio extracelular da proteína Notch adicionando xilose.
<i>MSH1</i>	Desempenha papel na proliferação e manutenção de células-tronco no SNC e está associado à formação de glioma e melanoma.
<i>INSM2</i>	Pode funcionar como um supressor de crescimento tumoral nas células do fígado e neurônios.

<i>PRR25</i>	Proteína rica em prolina. Função desconhecida.
<i>PPP1R9B</i>	Proteína que funciona como uma subunidade reguladora da proteína fosfatase. A expressão deste gene é particularmente elevada em dendritos, sugerindo papel na recepção de sinais do sistema nervoso central.
<i>HSH2D</i>	Possível modulador da resposta apoptótica, sinalização da tirosina quinase e CD28.
<i>PTH2</i>	Papel na ativação da Adenil ciclase, na elevação dos níveis de cálcio intracelular e, também, pode ter um papel na estimulação da espermatogênese.
<i>NLRP4</i>	Regulador negativo de autofagia celular.
<i>ADRA1D</i>	Regula o crescimento e a proliferação celular. Associado à hipertensão, hiperplasia prostática benigna e hiperplexia.
<i>ZNF831</i>	Proteína <i>zinc-finger</i> . Atua na construção de RNA.
<i>SRMS</i>	Atua na codificação de proteína quinase ligada na construção de ATP.

Tabela 11. Genes resultantes da filtragem das variantes em hemizigose, segundo padrão de herança ligada ao cromossomo X, com resumo de suas respectivas funções.

Gene	Função
<i>ARSF</i>	Expresso no retículo endoplasmático, é um membro da família sulfatase influenciando a composição do osso e na matriz cartilaginosa. Associada à Síndrome Punctata.
<i>MID1</i>	A proteína codificada atua como ponto de ancoragem aos microtúbulos. Associado à Síndrome Opitz.
<i>MAP3K15</i>	Membro da família quinase, participa no processo de morte celular por apoptose e está associada a deficiência da desidrogenase E1- alfa.
<i>CXorf22</i>	Codifica receptores de carcinoma pulmonar.
<i>DGKK</i>	Enzima que fosforila o diacilglicerol convertendo-o em ácido fosfatídico.
<i>FLJ44635</i>	Atua no microtúbulo fazendo ligação de cálcio e tem função de supressão de tumor.
<i>TCEAL5</i>	Membro da família de proteínas reguladoras da transcrição.
<i>ZCCHC18</i>	A proteína codificada pelo gene pertence à família de antígeno neoplásico que desempenha o fator de co-ativação de transcrição de receptor nuclear dependente de zinco.
<i>FRMPD3</i>	Expressa uma proteína pós-sináptica, atua na construção da região C-terminal de peptídeos. São expressos na membrana plasmática e também atua junto ao citoesqueleto.
<i>TFDP3</i>	Antígeno do carcinoma hepatocelular e testicular. Forma dímero para o controle do ciclo celular.
<i>GPR101</i>	Codifica receptores da proteína-G, contém 7 domínios transmembrana. Está associado ao acrogigantismo.
<i>MAGEC1</i>	Pertence à família de antígenos para o melanoma e ação citolítica para linfócitos T.

3.10.2. Visualização da variante no IGV e confirmação por sequenciamento Sanger

Previamente à validação por sequenciamento Sanger, a variante c.173G>T do gene *ENPP5* foi verificada visualmente usando o *software* IGV. O sequenciamento Sanger confirmou a variante *missense* em homozigose no paciente e em heterozigose nos dois genitores (Figura 17).

4. DISCUSSÃO

O diagnóstico de displasias esqueléticas é um desafio devido a sua grande heterogeneidade fenotípica e sobreposição de manifestações. Como estratégias para se estabelecer o diagnóstico dessas patologias é necessária a avaliação clínica, caracterização fenotípica, análise de exames complementares, radiográficos e testes genéticos (Warman, Cormier-daire, et al., 2011). O uso do sequenciamento de nova geração tem melhorado significativamente o diagnóstico das displasias esqueléticas por ser uma ferramenta capaz de distinguir a origem gênica e, assim, permitir conduta clínica/terapêutica adequada e personalizada resultando em melhor qualidade de vida ao paciente (Barkova et al., 2015a; Chai et al., 2000; Hall, 2002).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar o fenótipo e genótipo de um paciente portador de displasia esquelética autossômica recessiva, sem diagnóstico definido. Devido à gravidade das alterações orais, o paciente foi encaminhado para avaliação odontológica para realizar a caracterização e tratamento das alterações craniofaciais e orodentais. Essas alterações foram o ponto de partida para a descrição da displasia esquelética avaliada neste estudo.

Diante disso, a primeira parte do estudo concentrou-se na caracterização das manifestações orais do paciente avaliadas por análise histopatológica, ultraestrutural e pelo estabelecimento de cultura primária de fibroblastos. Algumas alterações orais como prognatismo, palato estreito, má oclusão dentária e atraso na erupção dos dentes são exemplos de manifestações clínicas heterogêneas, podendo estar presentes em outras síndromes já descritas (Costa et al., 2021; Suneja, Chopra, Thomas, & Pandian, 2016; Tosi & Warman, 2015). Os resultados avaliados nos ensaios da proliferação celular em cultivo de células e a análise pela imuno-histoquímica marcada com *Ki-67* não mostraram alterações estatísticas significativas comparado com as células dos indivíduos controle. Já os dados de morfometria do núcleo, apesar de ter apresentado alteração significativa, ou seja, os núcleos do paciente foram maiores comparado com os indivíduos controle, não há relação descrita na literatura que ampara esta alteração, sendo necessário estudos adicionais para associar este achado com a síndrome.

No entanto, destaca-se o crescimento anormal da pré-maxila, fibromatose gengival e a hiper cementose como características particulares. Nesse estudo, investigamos as características histopatológicas da gengiva. A fibromatose gengival é

definida pelo aumento lento e progressivo do tecido gengival que, por sua vez, pode se manifestar de forma localizada ou difusa. Em casos graves, o excesso de tecido pode recobrir as coroas dos dentes, causando problemas funcionais, estéticos e periodontais (Gawron, Łazarz-Bartyzel, Potempa, & Chomyszyn-Gajewska, 2016). A causa da fibromatose gengival é variada, incluindo aquelas de origem hereditária, induzidas por medicamentos ou as idiopáticas (Coletta & Graner, 2006; Goodwin et al., 2015; Meng, Huang, Ye, Fan, & Bian, 2007).

A fibromatose gengival hereditária pode ocorrer como uma condição isolada ou dentro de manifestações clínicas de algumas síndromes genéticas. Costa et al. (2020) atualizaram os dados da literatura em uma revisão sistemática que mapeou síndromes genéticas que possuem fibromatose gengival entre os sinais clínicos e associaram-na com a causa molecular. Dentre as 24 síndromes reconhecidamente envolvidas com o aumento do tecido gengival, a que se destaca pela maior ocorrência é a síndrome de Costello com 18,8% dos casos e a síndrome de Zimmermann-Laband com 11% desses. Em relação às bases moleculares, outros autores (Bauer et al., 2018a; Costa et al., 2021; Tommiska et al., 2017) agruparam genes que apresentam variantes patogênicas associados ao fenótipo de fibromatose gengival e verificaram que elas atuam como proteínas responsáveis pela regulação da bomba de prótons e de canais iônicos: *ABCC9*, *ATP6V1B1*, *KCNH1*, *KCNK4* e *KCNQ1*. Embora tenha sido demonstrado que canais iônicos desempenham papel na proliferação celular, a importância desses genes na patogênese da fibromatose gengival ainda é desconhecido (Bauer et al., 2018b). Outro gene que se destaca na presença de fibromatose gengival e alterações na mucosa oral são variantes recessivas no *FAM20A* (Dourado et al., 2019; Kantaputra et al., 2014; Kantaputra, Sirirungruangsarn, Intachai, & Ngamphiw, 2018; Yang et al., 2013). Contudo, até o momento, não foi descrito na literatura a associação de nenhuma variante patogênica do *ENPP5* como causa de fibromatose gengival, sendo este paciente, o primeiro relato descrito com esta manifestação clínica.

A fibromatose gengival também pode ser induzida por uso medicamentoso incluindo os anticonvulsivantes, imunossupressores e os bloqueadores de canais de cálcio (Gawron et al., 2016). A presença da hiperplasia gengival generalizada observada neste relato de caso poderia estar associada ao uso contínuo e de longa data de medicamento anticonvulsivante. Diversos estudos têm demonstrado que o uso contínuo de anticonvulsivantes (fenitoína, ciclosporina-A e nifedipina) podem induzir hiperplasia

gingival e/ou fibromatose gengival (Assaggaf, Kantarci, Sume, & Trackman, 2015; Trackman & Kantarci, 2004)

Entre os anticonvulsivantes, a fenitoína é o fármaco mais comumente associado à hiperplasia gengival. Entretanto, existem alguns relatos de casos que associam o valproato de sódio ao aumento gengival (Gawron et al., 2016; Rodríguez-Vázquez, Carrascosa-Romero, Pardal-Fernández, & Iniesta, 2007; Suneja et al., 2016). Sendo assim, a ocorrência da fibromatose gengival presente no paciente estudado poderia estar associado ao uso contínuo de valproato de sódio. Contudo, estudos histopatológicos demonstram que a hiperplasia gengival induzida pelos fármacos anticonvulsivantes e a fibromatose hereditária sindrômica, apresentam características histológicas marcantes, pelo aumento de fibrilas colágenas (Coletta & Graner, 2006; Meng et al., 2007). Acredita-se que o processo de fibrose observada na fibromatose seja em decorrência da remodelação da matriz extracelular em decorrência do aumento de fibras colágenas de colágeno tipo I (Acevedo, Poulter, Alves, de Lima, et al., 2015; Kather, Salgado, Salgado, Cortelli, & Pallos, 2008). Diferentemente do que é descrito na literatura, o resultado da avaliação histológica e ultraestrutural da biópsia do paciente deste estudo, mostrou o aumento de fibras elásticas e não o que era esperado nas descrições de fibromatose gengival sindrômica e naquelas induzidas por medicamentos, qual seja, aumento de fibras colágenas (Acevedo, Poulter, Alves, de Lima, et al., 2015; Costa et al., 2021; Goodwin et al., 2015; Meng et al., 2007). Até o presente momento, ainda não foi relatado na literatura nenhum caso com o aumento de fibras elásticas em fibromatose gengival a exemplo do relatado neste trabalho.

Outra manifestação relevante apresentada pelo paciente deste estudo é a presença de hipercementose em todos os dentes. O cemento dentário é o tecido mineralizado que recobre a raiz dentária e junto com o ligamento periodontal e osso alveolar controlam a ancoragem do dente no osso (Nanci, 2013). A hipercementose ocorre geralmente como uma resposta adaptativa ou como reparo em dentes erupcionados. No caso do paciente avaliado, a hipercementose foi observada em todos os dentes inclusive nos dentes não erupcionados sugerindo alteração no processo de biomineralização (Nanci, 2013; Thumbigere-Math et al., 2018).

A hipercementose é pouco avaliada em estudos que envolvem o diagnóstico de síndromes esqueléticas. Somente alguns poucos trabalhos, utilizando modelo animal, têm mostrado o envolvimento de alguns genes tais como *Ank* e *Enpp1* com a presença de hipercementose e alterações esqueléticas (Thumbigere-Math et al., 2018). A expressão

do *ENPPI* já foi relatada na literatura como ponto chave de influência no processo de cementogênese (Millán, 2013; Narisawa, Johnson, Terkeltaub, & Milla, 2004). Thumbigere-Math et al. (2017) avaliaram pacientes com alterações orais incluindo espessamento do cimento dentário associado à calcificações arteriais. Os resultados mostraram que pacientes que tiveram variante em *ENPPI*, apresentaram elevação em até 4 vezes na quantidade de cimento dentário comparado ao grupo controle.

A família de Endonucleases pirofosfatases/fosfodiesterases (ENPPs) formam um grupo de proteínas composto por sete representantes (ENPP1-7) e filogeneticamente conservadas, presente no genoma de bactérias, plantas e cordados. Essas enzimas interagem cataliticamente com nucleotídeos e são capazes de hidrolizar ligações pirofosfato e fosfodiéster de seus substratos em nucleosídeos monofosfatos (Massé, Bhamra, Allsop, Dale, & Jones, 2010). Essas proteínas também atuam no balanço extracelular de fosfato inorgânico e pirofosfato e são glicoproteínas transmembrana expressas em diferentes tecidos (Bollen, Gijssbers, Ceulemans, Stalmans, & Stefan, 2000).

Acredita-se que a ENPP5 tem função comum às outras proteínas da sua família, atuando na quebra de fosfato inorgânico e na hidrólise de ligações fosfodiéster. Porém, pouco se sabe sobre as outras funções catalíticas e biológicas dessa proteína (Goding, Grobber, & Slegers, 2003). Até o presente momento, nenhum outro relato na literatura descreveu alteração patogênica no *ENPP5* e nem mesmo relacionou esse gene com alterações orais e esqueléticas como aquelas descritas neste estudo. Apenas um membro desta família de genes (*ENPPI*) foi correlacionado com alterações no processo de biomineralização e hipercementose.

Além das alterações orais, o paciente apresenta manifestações sistêmicas do esqueleto que se caracterizam pela hiperostose da calota craniana, osteopenia em membros superiores e inferiores e em corpos vertebrais, cifoescoliose, alargamento da região metafisária distal e afinamento da cortical óssea dos ossos longos. Esses achados clínicos evidenciam desordem do metabolismo ósseo (Jansen et al., 2012).

O paciente em questão apresentou alterações esqueléticas que se caracterizaram pelo espessamento da matriz extracelular mineralizada em ossos que tiveram o processo de ossificação intramembranosa, a exemplo da hiperostose do crânio. Por outro lado, os ossos que tiveram ossificação endocondral apresentaram redução da matriz óssea, com afinamento da região cortical e alargamento da região metafisária distal (Long & Ornitz, 2013).

Muitos são os fatores que participam na osteogênese, na manutenção e no reparo ósseo em humanos. Nas últimas décadas têm sido descobertas novas moléculas e genes envolvidos no controle da ossificação e no metabolismo ósseo (Bartzela, Carels, & Maltha, 2017; Bayram et al., 2017; Cui et al., 2012). Dentre os membros da família das ENPPs, há relato de alterações no metabolismo de ossos longos em indivíduos com variante patogênica em *ENPPI*. A alteração nesse gene inibiu a mineralização do osso, que por sua vez, acarretou osteoporose, facilitando a ocorrência de fraturas (Zimmermann-Laband, Chacon-Camacho, and Johanna 2017). Contudo, mesmo apresentando diversas alterações esqueléticas, o paciente deste estudo não tem histórico de fraturas como visto em pacientes com variante em *ENPPI* (Eytan et al., 2013).

A variante do *ENPP5* observada aqui é rara e não há relatos de qualquer outro indivíduo com manifestações clínicas semelhantes a este paciente, de modo que não se sabe ao certo a participação da *ENPP5* no processo de osteogênese ou de metabolismo ósseo. Além disso, alterações esqueléticas e orodentais relacionadas a outro membro da família das ENPPs, mais especificamente o gene *ENPPI*, quando associado às análises dos dados de exoma que resultaram na descrição da variante *missense* (c.173G>T; p.Gly58Val) em homozigose no gene *ENPP5* com modo de herança recessiva como a única variante patogênica possível, corroboram a tese de que a variante *ENPP5* observada aqui é a causa genética desta nova síndrome observada.

Apesar da causa genética ter sido identificada, o pouco conhecimento sobre a função da *ENPP5* obriga a estruturação e execução de estudos funcionais utilizando modelos *in silico*, *in vitro* e modelos animais *knock-out* para a expansão da compreensão do papel do *ENPP5* na patogênese desta nova displasia esquelética.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, Edgar, Alejandra Rodríguez, Donovan Casas, and Esteban Espíndola. 2014. “[Thanatophoric dysplasia: case-based bioethical analysis].” *Medwave* 14(3): e5943.
- Acevedo, Ana Carolina et al. 2015. “Variability of Systemic and Oro-Dental Phenotype in Two Families with Non-Lethal Raine Syndrome with FAM20C Mutations.” *BMC Medical Genetics* 16(1): 1–11.
- Assaggaf, Mohammad A, Alpdogan Kantarci, Siddika S Sume, and Philip C Trackman. 2015. “Prevention of Phenytoin-Induced Gingival Overgrowth by Lovastatin in Mice.” *The American Journal of Pathology* 185(6): 1588–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.004>.
- Barbosa-Buck, Cecília O et al. 2012. “Clinical Epidemiology of Skeletal Dysplasias in South America.” *American journal of medical genetics. Part A* 158A(5): 1038–45.
- Barkova, E et al. 2015a. “Fetal Skeletal Dysplasias in a Tertiary Care Center: Radiology, Pathology, and Molecular Analysis of 112 Cases.” *Clinical genetics* 87(4): 330–37.
- . 2015b. “Fetal Skeletal Dysplasias in a Tertiary Care Center: Radiology, Pathology, and Molecular Analysis of 112 Cases.” *Clinical Genetics* 87(4): 330–37.
- Bartzela, Theodosia N, Carine Carels, and Jaap C Maltha. 2017. “Update on 13 Syndromes Affecting Craniofacial and Dental Structures.” 8(December).
- Bauer, Christiane K. et al. 2018a. “Mutations in KCNK4 That Affect Gating Cause a Recognizable Neurodevelopmental Syndrome.” *American Journal of Human Genetics* 103(4): 621–30. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.09.001>.
- Bauer, Christiane K et al. 2018b. “Mutations in KCNK4 That Affect Gating Cause a Recognizable Neurodevelopmental Syndrome.” *American journal of human genetics* 103(4): 621–30.
- Bayram, Yavuz et al. 2017. “REPORT REST Final-Exon-Truncating Mutations Cause Hereditary Gingival Fibromatosis.” : 149–56.
- Bollen, M et al. 2000. “Nucleotide Pyrophosphatases/Phosphodiesterases on the Move.” *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 35(6): 393–432.
- Bonafe, Luisa et al. 2015. “Nosology and Classification of Genetic Skeletal Disorders: 2015 Revision.” *American journal of medical genetics. Part A* 167A(12): 2869–92.
- Chai, Yang et al. 2000. “Fate of the Mammalian Cranial Neural Crest during Tooth and

- Mandibular Morphogenesis.” 1679: 1671–79.
- Coletta, Ricardo D., and Edgard Graner. 2006. “Hereditary Gingival Fibromatosis: A Systematic Review.” *Journal of Periodontology* 77(5): 753–64.
- Costa, Cláudio Rodrigues Rezende et al. 2021. “Syndromes with Gingival Fibromatosis: A Systematic Review.” *Oral Diseases* 27(4): 881–93.
- Cui, Yazhou et al. 2012. “A Systematic Review of Genetic Skeletal Disorders Reported in Chinese Biomedical Journals between 1978 and 2012.” : 1–13.
- Dourado, Mauricio Rocha et al. 2019. “Enamel Renal Syndrome: A Novel Homozygous FAM20A Founder Mutation in 5 New Brazilian Families.” *European journal of medical genetics* 62(11): 103561.
- Eytan, Ori et al. 2013. “Cole Disease Results from Mutations in ENPP1.” *The American Journal of Human Genetics* 93(4): 752–57.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.08.007>.
- Gawron, Katarzyna, Katarzyna Łazarz-Bartyzel, Jan Potempa, and Maria Chomyszyn-Gajewska. 2016. “Gingival Fibromatosis: Clinical, Molecular and Therapeutic Issues.” *Orphanet Journal of Rare Diseases* 11(1): 9.
<https://doi.org/10.1186/s13023-016-0395-1>.
- Goding, James W, Bert Grobber, and Herman Slegers. 2003. “Physiological and Pathophysiological Functions of the Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase / Phosphodiesterase Family.” 1638: 1–19.
- Goodwin, Alice F et al. 2015. “NIH Public Access.” 0(6): 1425–30.
- Gorlin, Robert J. 2001. “Asymmetry.” *American Journal of Medical Genetics* 101(4): 290–91. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1222>.
- Hall, Christine M. 2002. “International Nosology and Classification of Constitutional Disorders of Bone (2001).” *American journal of medical genetics* 113(1): 65–77.
- Jansen, Silvia et al. 2012. “Article Structure of NPP1 , an Ectonucleotide Pyrophosphatase / Phosphodiesterase Involved in Tissue Calcification.” *Structure/Folding and Design* 20(11): 1948–59.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2012.09.001>.
- Kantaputra, Piranit Nik et al. 2014. “Cutis Laxa with Pulmonary Emphysema , Conjunctivochalasis , Nasolacrimal Duct Obstruction , Abnormal Hair , and a Novel FBLN5 Mutation.” : 2370–77.
- Kantaputra, Piranit Nik, Yuddhasert Sirirungruangsarn, Worrachet Intachai, and Chumpol Ngamphiw. 2018. “Osteogenesis Imperfecta with Ectopic Mineralizations

- in Dentin and Cementum and a COL1A2 Mutation.” *Journal of Human Genetics*.
<http://dx.doi.org/10.1038/s10038-018-0448-5>.
- Kather, Jorge et al. 2008. “Clinical and Histomorphometric Characteristics of Three Different Families with Hereditary Gingival Fibromatosis.” *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 105(3): 348–52.
- Kornak, Uwe et al. 2010. “Three Novel Mutations in the ANK Membrane Protein Cause Craniometaphyseal Dysplasia with Variable Conductive Hearing Loss.” *American Journal of Medical Genetics Part A* 152A(4): 870–74.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33301>.
- Krakov, Deborah et al. 2008. “Evaluation of Prenatal-Onset Osteochondrodysplasias by Ultrasonography: A Retrospective and Prospective Analysis.” *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A(15): 1917–24. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32269>.
- Krakov, Deborah, and David L Rimoïn. 2010. “The Skeletal Dysplasias.” *Genetics in Medicine* 12(6): 327–41. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181daae9b>.
- Lin, Chia-wen et al. 2014. “Sarm1 Deficiency Impairs Synaptic Function and Leads to Behavioral Deficits , Which Can Be Ameliorated by an MGluR Allosteric Modulator RECORDING MATERIALS AND METHODS.” 8(April): 1–10.
- Long, Fanxin, and David M Ornitz. 2013. “Development of the Endochondral Skeleton.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(1). <http://cshperspectives.cshlp.org/>
 (January 10, 2022).
- . “Development of the Endochondral Skeleton.” : 1–20.
- Massé, Karine et al. 2010. “Ectophosphodiesterase/Nucleotide Phosphohydrolase (Enpp) Nucleotidases: Cloning, Conservation and Deveopmental Restriction.” *The International Journal of Developmental Biology* 54: 181–93.
- Meng, LiuYan et al. 2007. “Increased Expression of Collagen Prolyl 4-Hydroxylases in Chinese Patients with Hereditary Gingival Fibromatosis.” *Archives of oral biology* 52(12): 1209–14.
- Millán, José Luis. 2013. “The Role of Phosphatases in the Initiation of Skeletal Mineralization.” *Calcified tissue international* 93(4): 299–306.
- Möller, J L et al. 2002. *Métodos Diagnósticos: Consulta Rápida*. 1ª. eds. J L Möller et al. Porto Alegre: Artmed Editora.
- Mortier, Geert R et al. 2019. “Nosology and Classification of Genetic Skeletal Disorders: 2019 Revision.” *American Journal of Medical Genetics Part A* 179(12): 2393–2419.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajmg.a.61366>.

- Nanci, A. 2013. *Ten Cate Histologia Oral*. 8^a ed. Elsevier.
- Narayananan, V S et al. 2006. "Pyle ' s Disease : An Incidental Finding in a Routine Dental Patient." : 50–54.
- Narisawa, Sonoko, Kristen A Johnson, Robert Terkeltaub, and Luis Milla. 2004. "Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2 , Enpp1 , and Ank." 164(4): 1199–1209.
- Ramseyer, L T, J C Leonard, and T M Stacy. 1993. "Bone Scan Findings in Craniometaphyseal Dysplasia." *Clinical nuclear medicine* 18(2): 137–39.
- Reichenberger, E et al. 2001. "Autosomal Dominant Craniometaphyseal Dysplasia Is Caused by Mutations in the Transmembrane Protein ANK." *American journal of human genetics* 68(6): 1321–26.
- Rimoin, David L et al. 2007. "The Skeletal Dysplasias: Clinical-Molecular Correlations." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1117: 302–9.
- Rodríguez-Vázquez, M, M C Carrascosa-Romero, J M Pardal-Fernández, and I Iniesta. 2007. "Congenital Gingival Hyperplasia in a Neonate with Foetal Valproate Syndrome." *Neuropediatrics* 38(5): 251–52.
- Santos, Bruno. 2014. "Verhoeff & Tricrómio de Masson : Aplicações e Importância de Um Protocolo Verhoeff & Tricrómio de Masson : Aplicações e Importância de Um Protocolo Combinado." (May): 0–12.
- Simsek Kiper, Pelin O et al. 2016. "Cortical-Bone Fragility — Insights from SFRP4 Deficiency in Pyle's Disease." *New England Journal of Medicine* 374(26): 2553–62. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1509342>.
- Singh, Sumit, Curtis Qin, Srikanth Medarametla, and Shilpa V Hegde. 2016. "Craniometaphyseal Dysplasia in a 14-Month Old: A Case Report and Review of Imaging Differential Diagnosis." *Radiology case reports* 11(3): 260–65. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27594963>.
- Suneja, Bharat, Saroj Chopra, Abi M Thomas, and Jeyraj Pandian. 2016. "A Clinical Evaluation of Gingival Overgrowth in Children on Antiepileptic Drug Therapy." 10(1): 32–36.
- Thumbigere-Math, V et al. 2018. "Hypercementosis Associated with ENPP1 Mutations and GACI." *Journal of dental research* 97(4): 432–41.
- Tommiska, Johanna et al. 2017. "Two Missense Mutations in KCNQ1 Cause Pituitary Hormone Deficiency and Maternally Inherited Gingival Fibromatosis." *Nature Communications* 8(1): 1289. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01429-z>.

- Tosi, Laura L, and Matthew L Warman. 2015. "Mechanistic and Therapeutic Insights Gained from Studying Rare Skeletal Diseases." *Bone* 76: 67–75.
- Trackman, P C, and A Kantarci. 2004. "CONNECTIVE TISSUE METABOLISM AND GINGIVAL OVERGROWTH." 15(M): 165–75.
- Warman, Matthew L, Valerie Cormier-daire, et al. 2011. "Nosology and Classification of Genetic Skeletal Disorders : 2010 Revision." : 943–68.
- Warman, Matthew L, Valerie Cormier-Daire, et al. 2011. "Nosology and Classification of Genetic Skeletal Disorders: 2010 Revision." *American journal of medical genetics. Part A* 155A(5): 943–68.
- Yang, Yaping et al. 2013. "Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorders." *New England Journal of Medicine* 369(16): 1502–11. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306555>.
- Zimmermann-laband, Hypertrichosis, Oscar F Chacon-camacho, and V Johanna. 2017. "Expanding the Phenotype of Gingival Expanding the Phenotype of Gingival Fibromatosis – Mental Retardation – Hypertrichosis (Zimmermann – Laband) Syndrome." (June).

Considerações finais

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme apresentado nos capítulos desta tese, as discussões foram detalhadas em cada estudo individualmente restando este espaço considerações finais para associar os resultados de ambos os estudos e propor perspectivas envolvendo o diagnóstico de síndromes genéticas como um todo. Nos dois capítulos mostram a importância de uma equipe multiprofissional no acompanhamento destes pacientes para se estabelecer o diagnóstico e a melhor conduta terapêutica. Assim como, avaliações nem sempre tradicionais, como a análise morfológica aqui mostrada (avaliação histopatológica e ultraestrutural) foram ferramentas importantes para comparar com o resultado da análise molecular, ressaltando a importância de coleccionar informações clínicas dos pacientes para se chegar ao diagnóstico.

Os dois capítulos deste trabalho evidenciaram a importância da prática da fenotipagem aprofundada ao diagnóstico de pacientes, especialmente daqueles cujo diagnóstico clínico não é possível apenas pela anamnese e exame dismorfológico.. Assim, ao coleccionar informações de fenotipagem sob um olhar multiprofissional associado aos achados genotípicos identificados no exoma e outros métodos de avaliação, que em conjunto caracterizam a prática da fenotipagem aprofundada, foi possível definir o diagnóstico dos dois pacientes, uma, com deficiência congênita de vitamina B12 e o outro, portador de uma nova displasia esquelética.

O diagnóstico da paciente relatada no capítulo I permitiu tratamento específico, de fácil acesso, melhorando sobremaneira as queixas clínicas manifestadas pela deficiência da cobalamina. O diagnóstico desta paciente poderia ter ocorrido de forma precoce, caso na época do seu nascimento, tivesse disponível o teste de triagem neonatal de deficiência de cobalaminas. Outra questão que influenciou na demora em diagnosticar esta paciente, são as manifestações clínicas menos graves comparada aos pacientes portadores de variante patogênica em *LMBRDI*.

No capítulo II foi relatado um paciente com graves alterações orais e comprometimento esquelético. As manifestações clínicas foram iniciadas ainda na primeira infância com crises convulsivas de difícil controle e aparecimento da fibromatose gengival associada à troca dos dentes decíduos para os permanentes. A

prática da fenotipagem aprofundada fez a diferença para se chegar ao diagnóstico deste paciente. A forma de diagnosticar por uma equipe multiprofissional, unindo os dados fenotípicos, com histórico familiar, manifestações clínicas e avaliações não tradicionais como a biópsia de gengiva, a análise morfológica e celular associadas aos resultados genômicos, permitiu não só diagnosticar o paciente, como também descrever o primeiro caso com uma variante patogênica c.173G>T do gene *ENPP5* em homozigose com manifestações orais e sistêmicas, chegando assim à proposta de uma nova displasia esquelética.

O fato de ainda não haver relato na literatura de outros pacientes com sinais e sintomas semelhantes a este paciente descrito no capítulo II e pelo *ENPP5* ser um gene que até o então não tinha sido relacionado à displasia esquelética, fortalece a necessidade de melhor estudar a influência e o papel deste gene no processo de fibromatose gengival, na biomineralização, na relação com a hiperementose e a sua influência no processo de ossificação esquelética. Tudo isso, uma complementação da prática da fenotipagem aprofundada.

Portanto, este trabalho teve como premissa mostrar a importância de se realizar a fenotipagem aprofundada para o diagnóstico de síndromes genéticas. Compreender que a análise do fenótipo ultrapassa a avaliação das anormalidades observáveis de um paciente e indo além, cria com ela atalhos para a execução de uma medicina personalizada, faz compreender e definir o diagnóstico do paciente e, assim, permite oferecer o melhor cuidado terapêutico disponível para aquele indivíduo.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

- a. O trabalho mostrou a importância da fenotipagem aprofundada para o diagnóstico de síndromes genéticas.
- b. A deficiência de cobalamina (cblF) deve ser considerada para pacientes que apresentam hiperpigmentação cutânea.
- c. A raridade desse distúrbio, deficiência de cobalamina, é contrabalanceada por um tratamento prontamente disponível que pode prevenir complicações deletérias da deficiência da vitamina B12.
- d. A utilização da fenotipagem aprofundada permitiu descrever o primeiro caso de um paciente com variante patogênica em *ENPP5* com importantes manifestações orais e esqueléticas.
- e. A presença de múltiplas alterações orais e esqueléticas neste paciente portador de variante patogênica em *ENPP5* caracteriza uma nova displasia esquelética.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, E., Rodríguez, A., Casas, D., & Espíndola, E. (2014). [Thanatophoric dysplasia: case-based bioethical analysis]. *Medwave*, *14*(3), e5943. <https://doi.org/10.5867/medwave.2014.03.5943>
- Acevedo, A. C., Poulter, J. A., Alves, P. G., de Lima, C. L., Castro, L. C., Yamaguti, P. M., ... Mighell, A. J. (2015). Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations. *BMC Medical Genetics*, *16*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0154-5>
- Acevedo, A. C., Poulter, J. A., Alves, P. G., Lima, C. L. De, Castro, L. C., Yamaguti, P. M., ... Mighell, A. J. (2015). *Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations*. 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0154-5>
- Alfadhel, M., Lillquist, Y. P., Davis, C., Junker, A. K., & Stockler-Ipsiroglu, S. (2011). Eighteen-year follow-up of a patient with cobalamin F disease (cblF): Report and review. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *155*(10), 2571–2577. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34220>
- Altawil, L., Alshihry, H., Ahmed, H., Shamseldin, H. E., & Alkuraya, F. (2020). Vitamin B12 deficiency secondary to cobalamin F deficiency simulating dyskeratosis congenita. *JAAD Case Reports*, *6*(9), 882–885. <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2020.07.011>
- Armour, C. M., Brebner, A., Watkins, D., Geraghty, M. T., Chan, A., & Rosenblatt, D. S. (2013). A patient with an inborn error of vitamin B12 metabolism (cblf) detected by newborn screening. *Pediatrics*, *132*(1). <https://doi.org/10.1542/peds.2013-0105>
- Assaggaf, M. A., Kantarci, A., Sume, S. S., & Trackman, P. C. (2015). Prevention of Phenytoin-Induced Gingival Overgrowth by Lovastatin in Mice. *The American Journal of Pathology*, *185*(6), 1588–1599. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.004>
- Banerjee, R., Gherasim, C., & Padovani, D. (2009). The tinker, tailor, soldier in intracellular B12 trafficking. *Current Opinion in Chemical Biology*, *13*(4), 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.07.007>
- Barbosa-Buck, C. O., Orioli, I. M., da Graça Dutra, M., Lopez-Camelo, J., Castilla, E. E., & Cavalcanti, D. P. (2012). Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *158A*(5), 1038–1045. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35246>
- Barkova, E., Mohan, U., Chitayat, D., Keating, S., Toi, A., Frank, J., ... Glanc, P. (2015a). Fetal skeletal dysplasias in a tertiary care center: radiology, pathology, and molecular analysis of 112 cases. *Clinical Genetics*, *87*(4), 330–337. <https://doi.org/10.1111/cge.12434>

- Barkova, E., Mohan, U., Chitayat, D., Keating, S., Toi, A., Frank, J., ... Glanc, P. (2015b). Fetal skeletal dysplasias in a tertiary care center: radiology, pathology, and molecular analysis of 112 cases. *Clinical Genetics*, 87(4), 330–337. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cge.12434>
- Bartzela, T. N., Carels, C., & Maltha, J. C. (2017). *Update on 13 Syndromes Affecting Craniofacial and Dental Structures*. 8(December). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01038>
- Bauer, C. K., Calligari, P., Radio, F. C., Caputo, V., Dentici, M. L., Falah, N., ... Tartaglia, M. (2018a). Mutations in KCNK4 that Affect Gating Cause a Recognizable Neurodevelopmental Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 103(4), 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.09.001>
- Bauer, C. K., Calligari, P., Radio, F. C., Caputo, V., Dentici, M. L., Falah, N., ... Tartaglia, M. (2018b). Mutations in KCNK4 that Affect Gating Cause a Recognizable Neurodevelopmental Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 103(4), 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.09.001>
- Bayram, Y., White, J. J., Elcioglu, N., Cho, M. T., Zadeh, N., Gedikbasi, A., ... Gibbs, R. A. (2017). *REPORT REST Final-Exon-Truncating Mutations Cause Hereditary Gingival Fibromatosis*. 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.06.006>
- Bollen, M., Gijsbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W., & Stefan, C. (2000). Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35(6), 393–432. <https://doi.org/10.1080/10409230091169249>
- Bonafe, L., Cormier-Daire, V., Hall, C., Lachman, R., Mortier, G., Mundlos, S., ... Unger, S. (2015). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 167A(12), 2869–2892. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37365>
- Buers, I., Pennekamp, P., Nitschke, Y., Lowe, C., Skryabin, B. V, & Rutsch, F. (2016). *Lmbrd1* expression is essential for the initiation of gastrulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(8), 1523–1533. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jcmm.12844>
- Calame, D. G., Fatih, J. M., Herman, I., Coban-akdemir, Z., Du, H., Mitani, T., ... Lupski, J. R. (2021). *Deep clinicopathological phenotyping identifies a previously unrecognized pathogenic EMD splice variant*. 2052–2058. <https://doi.org/10.1002/acn3.51454>
- CATHRYN M. DELUDE. (2015). The details of disease (deep phenotyping). *Nature*, 527, 14–15.
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Han, J., Rowitch, D. H., ... Sucov, H. M. (2000). *Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis*. 1679, 1671–1679.
- Chiang, T. T., Hung, C. T., Wang, W. M., Lee, J. T., & Yang, F. C. (2013). Recreational nitrous oxide abuse-induced Vitamin B12 deficiency in a patient presenting with hyperpigmentation of the skin. *Case Reports in Dermatology*, 5(2), 186–191.

<https://doi.org/10.1159/000353623>

- Coelho, D., Kim, J. C., Miousse, I. R., Fung, S., Du Moulin, M., Buers, I., ... Baumgartner, M. R. (2012). Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nature Genetics*, 44(10), 1152–1155. <https://doi.org/10.1038/ng.2386>
- Coletta, R. D., & Graner, E. (2006). Hereditary Gingival Fibromatosis: A Systematic Review. *Journal of Periodontology*, 77(5), 753–764. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050379>
- Constantinou, P., D'Alessandro, M., Lochhead, P., Samant, S., Bisset, W. M., Hauptfleisch, C., & Dean, J. (2015). A New, Atypical Case of Cobalamin F Disorder Diagnosed by Whole Exome Sequencing. *Molecular Syndromology*, 6(5), 254–258. <https://doi.org/10.1159/000441134>
- Costa, C. R. R., Braz, S. V., de Toledo, I. P., Martelli-Júnior, H., Mazzeu, J. F., Guerra, E. N. S., ... Acevedo, A. C. (2021). Syndromes with gingival fibromatosis: A systematic review. *Oral Diseases*, 27(4), 881–893. <https://doi.org/10.1111/odi.13369>
- Cui, Y., Zhao, H., Liu, Z., Liu, C., Luan, J., Zhou, X., & Han, J. (2012). *A systematic review of genetic skeletal disorders reported in Chinese biomedical journals between 1978 and 2012*. 1–13.
- Dassa, E., & Bouige, P. (2001). The ABC of ABCs: A phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology*, 152(3–4), 211–229. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01194-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01194-9)
- Deme, J. C., Hancock, M. A., Xia, X., Shintre, C. A., Plesa, M., Kim, J. C., ... Coulton, J. W. (2014). Purification and interaction analyses of two human lysosomal vitamin B12 transporters: LMBD1 and ABCD4. *Molecular Membrane Biology*, 31(7–8), 250–261. <https://doi.org/10.3109/09687688.2014.990998>
- Divaris, K. (2019). Searching Deep and Wide: Advances in the Molecular Understanding of Dental Caries and Periodontal Disease. *Advances in Dental Research*, 30(2), 40–44. <https://doi.org/10.1177/0022034519877387>
- Dourado, M. R., Dos Santos, C. R. R., Dumitriu, S., Iancu, D., Albanyan, S., Kleta, R., ... Marques Mesquita, A. T. (2019). Enamel renal syndrome: A novel homozygous FAM20A founder mutation in 5 new Brazilian families. *European Journal of Medical Genetics*, 62(11), 103561. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.10.013>
- Duff Putu, Jean Shoveller., Julio Montaner., Cindy Feng., Rachel Nicoletti., Kate Shannon ., G. O. (2016). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2019.103286>.Pathway
- Eytan, O., Morice-picard, F., Sarig, O., Ezzedine, K., Isakov, O., Li, Q., ... Sprecher, E. (2013). Cole Disease Results from Mutations in ENPP1. *The American Journal of Human Genetics*, 93(4), 752–757. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.08.007>
- Fassihi, H., Sethi, M., Fawcett, H., Wing, J., Chandler, N., Mohammed, S., ... Lehmann, A. R. (2016). Deep phenotyping of 89 xeroderma pigmentosum patients reveals

- unexpected heterogeneity dependent on the precise molecular defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(9), E1236–E1245. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519444113>
- Ferns, J. M., & Halpern, S. H. (2018). Lysosomal storage diseases. *Consults in Obstetric Anesthesiology*, 357–360. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59680-8_98
- Fettelschoss, V., Burda, P., Sagné, C., Coelho, D., De Laet, C., Lutz, S., ... Baumgartner, M. R. (2017). Clinical or ATPase domain mutations in ABCD4 disrupt the interaction between the Vitamin B12-trafficking proteins ABCD4 and LMBD1. *Journal of Biological Chemistry*, 292(28), 11980–11991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784819>
- Gailus, S., Suormala, T., Malerczyk-Aktas, A. G., Toliat, M. R., Wittkamp, T., Stucki, M., ... Rutsch, F. (2010). A novel mutation in LMBRD1 causes the cblF defect of vitamin B12 metabolism in a Turkish patient. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-9032-7>
- Gawron, K., Łazarz-Bartyzel, K., Potempa, J., & Chomyszyn-Gajewska, M. (2016). Gingival fibromatosis: clinical, molecular and therapeutic issues. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0395-1>
- Genin, E. C., Geillon, F., Gondcaille, C., Athias, A., Gambert, P., Trompier, D., & Savary, S. (2011). Substrate specificity overlap and interaction between adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) and adrenoleukodystrophy-related protein (ALDRP/ABCD2). *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8075–8084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211912>
- Gibbs, R. A. (2020). The Human Genome Project changed everything. *Nature Reviews Genetics*, 21(10), 575–576. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0275-3>
- Goding, J. W., Grobber, B., & Slegers, H. (2003). *Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase family*. 1638, 1–19. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(03\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(03)00058-9)
- Goodwin, A. F., Oberoi, S., Landan, M., Charles, C., Massie, J. C., Fairley, C., ... Klein, O. D. (2015). *NIH Public Access*. 0(6), 1425–1430. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36475.Craniofacial>
- Gorlin, R. J. (2001). Asymmetry. *American Journal of Medical Genetics*, 101(4), 290–291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajmg.1222>
- Hall, C. M. (2002). International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001). *American Journal of Medical Genetics*, 113(1), 65–77. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10828>
- Huemer, M., & Baumgartner, M. R. (2019). The clinical presentation of cobalamin-related disorders: From acquired deficiencies to inborn errors of absorption and intracellular pathways. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42(4), 686–705. <https://doi.org/10.1002/jimd.12012>
- Husny, A. S. El, & Fernandes-Caldato, M. C. (2006). Erros inatos do metabolismo:

revisão de literatura. *Revista Paraense de Medicina*, 20(2), 41–45. <https://doi.org/10.5123/s0101-59072006000200008>

Jansen, S., Perrakis, A., Ulens, C., Winkler, C., Andries, M., Joosten, R. P., ... Bollen, M. (2012). Article Structure of NPP1 , an Ectonucleotide Pyrophosphatase / Phosphodiesterase Involved in Tissue Calcification. *Structure/Folding and Design*, 20(11), 1948–1959. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.09.001>

Kantaputra, P. N., Kaewgahya, M., Wiwatwongwana, A., Wiwatwongwana, D., Sittiwangkul, R., Iamaroon, A., & Dejkhamron, P. (2014). *Cutis Laxa with Pulmonary Emphysema , Conjunctivochalasis , Nasolacrimal Duct Obstruction , Abnormal Hair , and a Novel FBLN5 Mutation*. 2370–2377. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36630>

Kantaputra, P. N., Sirirungruangsarn, Y., Intachai, W., & Ngamphiw, C. (2018). Osteogenesis imperfecta with ectopic mineralizations in dentin and cementum and a COL1A2 mutation. *Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s10038-018-0448-5>

Kather, J., Salgado, M. A. C., Salgado, U. F. L., Cortelli, J. R., & Pallos, D. (2008). Clinical and histomorphometric characteristics of three different families with hereditary gingival fibromatosis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 105(3), 348–352. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.06.006>

Kawaguchi, K., Okamoto, T., Morita, M., & Imanaka, T. (2016). Translocation of the ABC transporter ABCD4 from the endoplasmic reticulum to lysosomes requires the escort protein LMBD1. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep30183>

Komlosi, K., Sólyom, A., & Beck, M. (2016). The Role of Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Lysosomal Storage Disorders. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening*, 4, 232640981666937. <https://doi.org/10.1177/2326409816669376>

Kornak, U., Brancati, F., Le Merrer, M., Lichtenbelt, K., Höhne, W., Tinschert, S., ... Nürnberg, P. (2010). Three novel mutations in the ANK membrane protein cause craniometaphyseal dysplasia with variable conductive hearing loss. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A(4), 870–874. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33301>

Krakov, D., Alanay, Y., Rimoin, L. P., Lin, V., Wilcox, W. R., Lachman, R. S., & Rimoin, D. L. (2008). Evaluation of prenatal-onset osteochondrodysplasias by ultrasonography: A retrospective and prospective analysis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146A(15), 1917–1924. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32269>

Krakov, D., & Rimoin, D. L. (2010). The skeletal dysplasias. *Genetics in Medicine*, 12(6), 327–341. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181daae9b>

Lin, C., Chen, C., Cheng, S., Hu, H., & Hsueh, Y. (2014). *Sarm1 deficiency impairs synaptic function and leads to behavioral deficits , which can be ameliorated by an mGluR allosteric modulator RECORDING MATERIALS AND METHODS*. 8(April),

1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00087>

- Liu, C., Ta, C. N., Rogers, J. R., Li, Z., Lee, J., Butler, A. M., ... Weng, C. (2019). Ensembles of natural language processing systems for portable phenotyping solutions. *Journal of Biomedical Informatics*, *100*, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2019.103318>
- Long, F., & Ornitz, D. M. (2013). Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008334>
- Magrinelli, F., Balint, B., & Bhatia, K. P. (2021). Challenges in Clinicogenetic Correlations: One Gene – Many Phenotypes. *Movement Disorders Clinical Practice*, *8*(3), 299–310. <https://doi.org/10.1002/mdc3.13165>
- Massé, K., Bhamra, S., Allsop, G., Dale, N., & Jones, E. A. (2010). Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction. *The International Journal of Developmental Biology*, *54*, 181–193. <https://doi.org/10.1387/ijdb.092879km>
- Meng, L., Huang, M., Ye, X., Fan, M., & Bian, Z. (2007). Increased expression of collagen prolyl 4-hydroxylases in Chinese patients with hereditary gingival fibromatosis. *Archives of Oral Biology*, *52*(12), 1209–1214. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.07.006>
- Millán, J. L. (2013). The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcified Tissue International*, *93*(4), 299–306. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9672-8>
- Miousse, I. R., Watkins, D., Coelho, D., Rugar, T., Crombez, E. A., Vilain, E., ... Rosenblatt, D. S. (2009). Clinical and Molecular Heterogeneity in Patients with the CblD Inborn Error of Cobalamin Metabolism. *Journal of Pediatrics*, *154*(4), 551–556. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.10.043>
- Miousse, I. R., Watkins, D., & Rosenblatt, D. S. (2011). Novel splice site mutations and a large deletion in three patients with the cblF inborn error of vitamin B12 metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, *102*(4), 505–507. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.01.002>
- Möller, J. L., Soares, F., Pasqualotto, A. C., Rosa, D. D., & Leite, V. R. S. (2002). *Métodos Diagnósticos: consulta rápida* (1ª; J. L. Möller, F. Soares, A. C. Pasqualotto, D. D. Rosa, & V. R. S. Leite, Eds.). Porto Alegre: Artmed Editora.
- Mori, K., Ando, I., & Kukita, A. (2001). Generalized hyperpigmentation of the skin due to vitamin B12 deficiency. *Journal of Dermatology*, *28*(5), 282–285. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2001.tb00134.x>
- Mortier, G. R., Cohn, D. H., Cormier-Daire, V., Hall, C., Krakow, D., Mundlos, S., ... Warman, M. L. (2019). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *179*(12), 2393–2419. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61366>

- Nagapan, T. S., Lim, W. N., & Basri, D. F. (2019). *Oral supplementation of L-glutathione prevents ultraviolet B-induced melanogenesis and oxidative stress in BALB / c mice*. 68(June), 541–548.
- Nanci, A. (2013). *Ten Cate Histologia Oral* (8^a ed.). Elsevier.
- Narayananan, V. S., Ashok, L., Mamatha, G. P., Rajeshwari, A., & Prasad, S. S. (2006). *Pyle ' s disease: an incidental finding in a routine dental patient*. 50–54. <https://doi.org/10.1259/dmfr/44987850>
- Narisawa, S., Johnson, K. A., Terkeltaub, R., & Milla, L. (2004). *Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2 , Enpp1 , and Ank*. 164(4), 1199–1209.
- Oladipo, O., Rosenblatt, D. S., Watkins, D., Miousse, I. R., Sprietsma, L., Dietzen, D. J., & Shinawi, M. (2011). Cobalamin F disease detected by newborn screening and follow-up on a 14-year-old patient. *Pediatrics*, 128(6). <https://doi.org/10.1542/peds.2010-3518>
- Papa, V., Tarantino, L., Preda, P., Badiali De Giorgi, L., Fanin, M., Pegoraro, E., ... Cenacchi, G. (2010). The role of ultrastructural examination in storage diseases. *Ultrastructural Pathology*, 34(5), 243–251. <https://doi.org/10.3109/01913121003780593>
- Raine, J., Winter, R. M., Davey, A., & Tucker, S. M. (1989). Unknown syndrome: Microcephaly, hypoplastic nose, exophthalmos, gum hyperplasia, cleft palate, low set ears, and osteosclerosis. *Journal of Medical Genetics*, 26(12), 786–788. <https://doi.org/10.1136/jmg.26.12.786>
- Ramseyer, L. T., Leonard, J. C., & Stacy, T. M. (1993). Bone scan findings in craniometaphyseal dysplasia. *Clinical Nuclear Medicine*, 18(2), 137–139. <https://doi.org/10.1097/00003072-199302000-00011>
- Reichenberger, E., Tiziani, V., Watanabe, S., Park, L., Ueki, Y., Santanna, C., ... Olsen, B. R. (2001). Autosomal dominant craniometaphyseal dysplasia is caused by mutations in the transmembrane protein ANK. *American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1321–1326. <https://doi.org/10.1086/320612>
- Rimoin, D. L., Cohn, D., Krakow, D., Wilcox, W., Lachman, R. S., & Alanay, Y. (2007). The skeletal dysplasias: clinical-molecular correlations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1117, 302–309. <https://doi.org/10.1196/annals.1402.072>
- Robinson, P. N. (2012). Deep phenotyping for precision medicine. *Human Mutation*, 33(5), 777–780. <https://doi.org/10.1002/humu.22080>
- Robinson, P. N., Mungall, C. J., & Haendel, M. (2015). Capturing phenotypes for precision medicine. *Molecular Case Studies*, 1(1), a000372. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000372>
- Rodríguez-Vázquez, M., Carrascosa-Romero, M. C., Pardal-Fernández, J. M., & Iniesta, I. (2007). Congenital gingival hyperplasia in a neonate with foetal valproate syndrome. *Neuropediatrics*, 38(5), 251–252. <https://doi.org/10.1055/s-2007-985901>

- Rutsch, F., Gailus, S., Miousse, I. R., Suormala, T., Sagné, C., Toliat, M. R., ... Nürnberg, P. (2009). Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nature Genetics*, 41(2), 234–239. <https://doi.org/10.1038/ng.294>
- Rutsch, F., Gailus, S., Suormala, T., & Fowler, B. (2011). LMBRD1: The gene for the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(1), 121–126. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9083-9>
- Santos, B. (2014). *Verhoeff & Tricrómio de Masson : Aplicações e Importância de um Protocolo Verhoeff & Tricrómio de Masson : Aplicações e Importância de um Protocolo Combinado*. (May), 0–12.
- Shih, V. E., Axel, S. M., Tewksbury, J. C., Watkins, D., Cooper, B. A., & Rosenblatt, D. S. (1989). Defective lysosomal release of vitamin B12 (cblF): A hereditary cobalamin metabolic disorder associated with sudden death. *American Journal of Medical Genetics*, 33(4), 555–563. <https://doi.org/10.1002/AJMG.1320330431>
- Simpson, J. K., Martinez-Queipo, M., Onoufriadis, A., Tso, S., Glass, E., Liu, L., ... McGrath, J. A. (2020). Genotype–phenotype correlation in a large English cohort of patients with autosomal recessive ichthyosis. *British Journal of Dermatology*, 182(3), 729–737. <https://doi.org/10.1111/bjd.18211>
- Simsek Kiper, P. O., Saito, H., Gori, F., Unger, S., Hesse, E., Yamana, K., ... Baron, R. (2016). Cortical-Bone Fragility — Insights from sFRP4 Deficiency in Pyle’s Disease. *New England Journal of Medicine*, 374(26), 2553–2562. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1509342>
- Singh, S., Qin, C., Medarametla, S., & Hegde, S. V. (2016). Craniometaphyseal dysplasia in a 14-month old: a case report and review of imaging differential diagnosis. *Radiology Case Reports*, 11(3), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.radcr.2016.04.006>
- Sloan, J. L., Carrillo, N., Adams, D., & Venditti, C. P. (1993). Disorders of Intracellular Cobalamin Metabolism. *GeneReviews®*, 1, 1–42.
- Son, J. H., Xie, G., Yuan, C., Ena, L., Li, Z., Goldstein, A., ... Wang, K. (2018). Deep Phenotyping on Electronic Health Records Facilitates Genetic Diagnosis by Clinical Exomes. *American Journal of Human Genetics*, 103(1), 58–73. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.05.010>
- Sremba, L., McCandless, S., & Baker, P. (2020). Concerning “Diagnostic Exome Sequencing and Tailored Bioinformatics of the Parents of a Deceased Child with Cobalamin Deficiency Suggests Digenic Inheritance of the MTR and LMBRD1 Genes” by Farwell Gonzalez et al. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 43(2), 157–158. <https://doi.org/10.1002/jimd.12148>
- Suneja, B., Chopra, S., Thomas, A. M., & Pandian, J. (2016). *A Clinical Evaluation of Gingival Overgrowth in Children on Antiepileptic Drug Therapy*. 10(1), 32–36. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/16443.7069>
- Takeichi, T., Hsu, C. K., Yang, H. S., Chen, H. Y., Wong, T. W., Tsai, W. L., ... McGrath, J. A. (2015). Progressive hyperpigmentation in a Taiwanese child due to an inborn

- error of vitamin B12 metabolism (cblJ). *British Journal of Dermatology*, 172(4), 1111–1115. <https://doi.org/10.1111/bjd.13413>
- Thumbigere-Math, V., Alqadi, A., Chalmers, N. I., Chavez, M. B., Chu, E. Y., Collins, M. T., ... Foster, B. L. (2018). Hypercementosis Associated with ENPP1 Mutations and GACI. *Journal of Dental Research*, 97(4), 432–441. <https://doi.org/10.1177/0022034517744773>
- Tommiska, J., Käsäkoski, J., Skibsbye, L., Vaaralahti, K., Liu, X., Lodge, E. J., ... Raivio, T. (2017). Two missense mutations in KCNQ1 cause pituitary hormone deficiency and maternally inherited gingival fibromatosis. *Nature Communications*, 8(1), 1289. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01429-z>
- Tong, F., Yang, R. L., Chen, R., & Zhao, Z. Y. (2019). The first case of cobalamin F disorder in China: Report and literature review. *Hong Kong Journal of Paediatrics*, 24(1), 43–47.
- Tosi, L. L., & Warman, M. L. (2015). Mechanistic and therapeutic insights gained from studying rare skeletal diseases. *Bone*, 76, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.03.016>
- Trackman, P. C., & Kantarci, A. (2004). *C ONNECTIVE T ISSUE M ETABOLISM AND G INGIVAL O VERGROWTH*. 15(M), 165–175.
- Van Roermund, C. W. T., Ijlst, L., Wagemans, T., Wanders, R. J. A., & Waterham, H. R. (2014). A role for the human peroxisomal half-transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(4), 563–568. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.001>
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. 3(3), 281–290.
- Vassiliadis, A., Rosenblatt, D. S., Cooper, B. A., & Bergeron, J. J. M. (1991). Lysosomal cobalamin accumulation in fibroblasts from a patient with an inborn error of cobalamin metabolism (cblF complementation group): Visualization by electron microscope radioautography. *Experimental Cell Research*, 195(2), 295–302. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90376-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90376-6)
- Waggoner, D. J., Ueda, K., Mantia, C., & Dowton, S. B. (1998). Methylmalonic aciduria (cblF): Case report and response to therapy. *American Journal of Medical Genetics*, 79(5), 373–375. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19981012\)79:5<373::AID-AJMG8>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19981012)79:5<373::AID-AJMG8>3.0.CO;2-K)
- Warman, M. L., Cormier-Daire, V., Hall, C., Krakow, D., Lachman, R., LeMerrer, M., ... Superti-Furga, A. (2011). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 155A(5), 943–968. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33909>
- Warman, M. L., Cormier-daïre, V., Hall, C., Krakow, D., Lachman, R., Lemerrer, M., ... Unger, S. (2011). *Nosology and Classification of Genetic Skeletal Disorders : 2010 Revision*. 943–968. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33909>

- Watkins, D., & Rosenblatt, D. S. (1986). Failure of lysosomal release of vitamin B12: A new complementation group causing methylmalonic aciduria (cblF). *American Journal of Human Genetics*, 39(3), 404–408.
- Weng, C., Shah, N. H., & Hripcsak, G. (2020). Deep phenotyping: Embracing complexity and temporality—Towards scalability, portability, and interoperability. *Journal of Biomedical Informatics*, 105(January). <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2020.103433>
- Werneck, L. C., Lorenzoni, P. J., Kay, C. S. K., & Scola, R. H. (2013). Muscle biopsy in Pompe disease. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 71(5), 284–289. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130022>
- WONG, S. -N, LOW, L. C., LAU, Y. -L, NICHOLLS, J., & CHAN, M. Y. (1992). Immunodeficiency in methylmalonic acidaemia. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 28(2), 180–183. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.1992.tb02638.x>
- Wright, J. T., & Herzberg, M. C. (2021). Science for the Next Century: Deep Phenotyping. *Journal of Dental Research*, 100(8), 785–789. <https://doi.org/10.1177/00220345211001850>
- Yang, Y., Muzny, D. M., Reid, J. G., Bainbridge, M. N., Willis, A., Ward, P. A., ... Eng, C. M. (2013). Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorders. *New England Journal of Medicine*, 369(16), 1502–1511. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306555>
- Zhang, L., Bhavsar, A. P., Lee, J. J. Y., Drögemöller, B. I., Abdelsayed, M., Cameron, J., ... Ipsiroglu, S. S. (2016). *Exome Sequencing and the Management of Neurometabolic Disorders*. 2246–2255. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1515792>
- Zimmermann-laband, H., Chacon-camacho, O. F., & Johanna, V. (2017). *Expanding the Phenotype of Gingival Expanding the Phenotype of Gingival Fibromatosis – Mental Retardation – Hypertrichosis (Zimmermann – Laband) Syndrome*. (June). <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34030>