



**Altina Maria
dos Ramos Lopes**

**ESTUDO DAS BASES MOLECULARES DA
CISTINÚRIA NA POPULAÇÃO PORTUGUESA**



**Altina Maria
dos Ramos Lopes**

**ESTUDO DAS BASES MOLECULARES DA
CISTINÚRIA NA POPULAÇÃO PORTUGUESA**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Mendo, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Mestre Maria Luís Westerman Cardoso, Assessora Superior de Genética.

Dedico este trabalho à minha família e amigos pelo apoio, compreensão e carinho dispensado.

o júri

presidente

Professora Doutora Adelaide Almeida
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

Professor Doutor Agostinho Franklim Pinto Marques
Professor Auxiliar da Faculdade de Farmácia da UP

Dr.ª Maria Luís Moral Westerman Cardoso
Assessor Superior de Genética,
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A realização deste trabalho contou com o apoio, interesse, boa vontade e disponibilidade de muitos. Não poderia portanto, deixar de dizer a todos o meu mais sincero “*muito obrigado*”.

Um obrigado muito especial à **Dra. Maria Luís Cardoso**, que me confiou a elaboração deste trabalho, pelo modo como soube orientá-lo, pela disponibilidade, atenção e carinho.

À **Dr.^a Céu Mota, Dr.^a Conceição Mota, Dr.^a Esmeralda Martins e Dr.^a Mafalda Barbosa** pelo tempo que disponibilizaram para consultas, recolha de informação, partilha e contextualização do historial clínico dos doentes e pelo interesse demonstrado no trabalho.

À **Dr.^a Dulce Quelhas**, ao **Dr. Jorge Oliveira**, à **Doutora Lúcia Lacerda**, à **Dr.^a Rosário Santos** e à **Doutora Sandra Alves** quero manifestar a minha gratidão pelo apoio e fornecimento de recursos e meios adequados para a elaboração deste trabalho, o que nem sempre foi fácil.

Ao **Dr. Paulo Santos**, que muito mais que um colega é um amigo, obrigado pela partilha de tecnologia, conhecimentos e meios que se revelaram indispensáveis na elaboração desta tese.

À **Dr.^a Francisca Coutinho** e ao **Dr. Sérgio Barros** agradeço as sugestões e espírito crítico.

À **Dr.^a Maria José Ortigão** e à **Paula Machado**, pela disponibilidade dispensada na recolha de dados e tratamento informático dos mesmos.

Aos **colegas que analisaram os aminoácidos** e que ao longo destes anos têm identificado os perfis característicos de cistinúria.

A **todos os outros colegas e colaboradores** da Unidade de Bioquímica Genética que, de algum modo, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Aos **doentes e respectivas famílias**.

Ao **meu marido** que me apoiou incondicionalmente neste percurso.

Aos meus **familiares e amigos**, que com muita paciência, compreensão e carinho souberam animar as horas difíceis.

palavras-chave

cistinúria, litíase renal, aminoácidos, cistina, *SLC3A1*, *SLC7A9*, haplotipos.

resumo

A cistinúria é uma doença genética autossómica recessiva com uma prevalência variável, afectando cerca de 1/7000 indivíduos. Caracteriza-se por um transporte deficiente de cistina e aminoácidos básicos (lisina, arginina e ornitina) através das células epiteliais dos túbulos renais proximais e do tracto gastrointestinal. A alta concentração de cistina no tracto urinário leva à formação de cálculos renais. O quadro clínico desenvolvido pelos doentes é resultante da urolitíase cursando com cólicas e infecções urinárias de repetição, evoluindo por vezes para insuficiência renal.

Com base na excreção dos aminoácidos básicos e cistina definem-se dois tipos de fenótipo: tipo I e tipo não I. Os heterozigotos tipo I têm aminoacidúria normal, enquanto os heterozigotos do tipo não I têm, habitualmente, excreção aumentada cistina e aminoácidos básicos.

Nos últimos anos foi proposta uma nova classificação de cistinúria baseada nos aspectos genéticos da doença: cistinúria tipo A, causada por mutações no gene *SLC3A1* (localizado em 2p16.3-21 e codificante da subunidade rBAT), tipo B, causada por mutações no gene *SLC7A9* (localizado em 19q12-13.1 e codificante da subunidade b^{0,+}AT) e tipo AB, com hereditariedade digénica. A prevalência dos tipos A e B é semelhante, mas o tipo AB tem uma frequência muito baixa, pelo que persistem dúvidas quanto à herança digénica.

O objectivo deste trabalho consistiu no levantamento das famílias portuguesas com cistinúria e no estudo das bases moleculares da cistinúria na nossa população, a fim de se estabelecer um diagnóstico definitivo nos casos, estabelecer uma relação entre a excreção de aminoácidos e determinados genótipos, possibilitar a identificação de genótipos de risco de nefrolitíase e compreender melhor a patologia.

A amostra seleccionada para este estudo incluiu 12 doentes e respectivos familiares com diagnóstico clínico e/ou bioquímico de cistinúria. Foi utilizada uma amostra de urina para estudo do perfil dos aminoácidos por cromatografia líquida de troca-iónica e DNA genómico para realizar o estudo molecular dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*. Em três famílias também foi efectuada uma análise ao c.DNA.

Foram detectadas 15 alterações na sequência do gene *SLC3A1*, cinco das quais novas, sendo três patogénicas c.611-2A>C (mutação de *splicing*), c.1190A>C (ou p.Y397C) e c.15997>A (ou p.Y533N) ambas mutações *missense*; e duas variações consideradas não patogénicas c.*70A>G e c.1136+44G>A. No gene *SLC7A9* foram encontradas 24 alterações de sequência, três das quais não tinham sido previamente descritas na literatura: duas correspondem a substituições por codões homólogos c.216>T (ou p.C72C) e c.1119G>A (ou p.S373S), e uma localizada na extremidade 3'-c*82C>T.

A identificação das bases moleculares da cistinúria na população portuguesa irá proporcionar conhecimento científico que contribuirá para o melhor reconhecimento da patologia e oferecer informação complementar para o aconselhamento genético e um diagnóstico definitivo às famílias.

keywords

cystinuria, nephrolithiasis, amino acids, cystine, *SLC3A1*, *SLC7A9*, haplotypes.

abstract

Cystinuria is an autosomal-recessive genetic disorder. Its worldwide prevalence varies considerably, affecting approximately 1 in 7 000 people. The disorder is characterized by an impaired transport of the amino acids cystine, ornithine, lysine, and arginine due to a defective subunit of the transporter molecule located in the proximal renal tubule and gastro-intestinal cells. The natural history of cystinuria is marked by recurrent episodes of stone formation, which has been shown to be associated with chronic urinary tract infections, renal impairment and end-stage renal failure in some cases.

Based on the excretion of cystine and dibasic amino acids in urine, two types of cystinuria were identified: Type I and non-type I. Type I follows an autosomal recessive trait, and heterozygotes show a normal amino aciduria. In contrast, non-type I heterozygotes exhibit increased excretion of cystine and the dibasic amino acids.

Two genes have been reported so far to account for the genetic basis of cystinuria. The *SLC3A1* gene located on chromosome 2p16.3-21 and the *SLC7A9* gene located on chromosome 19q12-13.1 and a new classification of cystinuria was proposed based on genetic data: cystinuria type A if it is caused by mutations on *SLC3A1* gene (that codifies for rBAT subunit), type B involving mutations on *SLC7A9* gene (which codifies for b^{0,+}AT subunit), and type AB if there is a digenic inheritance. The prevalence of both types A and B is quite similar according with bibliography, nevertheless type AB is so low that there are doubts if it really exists.

The main objective of this investigation was to collect Portuguese families with cystinuria and to investigate molecular bases of cystinuria in our population in order to reach a final diagnosis, establish a relation between biochemical and molecular data, recognize genotypes with higher risk for nephrolithiasis and to contribute for a better understanding of the disease.

For this investigation we selected a cohort of 12 patients with clinical and/or biochemical diagnosis of cystinuria as well as their relatives. An urine sample was collected for amino acids analysis by liquid-chromatography and blood for DNA extraction and screening for mutations on *SLC3A1* and *SLC7A9* genes. In 3 families cDNA was also studied.

Fifteen alterations on *SLC3A1* gene sequence were detected, five of them were novel: three were classified as real mutations c.611-2A>C (*splicing* mutation), c.1190A>C (p.Y397C), c.15997>A (p.Y533N) these as *missense mutations*; and two variations without clinical significance c. *70A>G and c.1136+44G>A. On *SLC7A9* gene 24 sequence alterations were identified, three of them were not previously reported; two are substitutions by identical codons c.216>T (p.C72C) and c.1119G>A (p.S373S), and c.*82C>T.

The identification of molecular bases of cystinuria in portuguese population will contribute for improving the knowledge of this disease and to offer additional information for genetic counseling and a definite diagnosis of affected patients.

ÍNDICE

I-INTRODUÇÃO	3
1.1. Erros Inatos do Metabolismo – Generalidades	3
1.2. Aminoácidos	4
1.3. Classificação dos aminoácidos	5
1.4. Alteração no processamento celular dos aminoácidos	5
1.5. Absorção e reabsorção de aminoácidos	6
1.6. Aminoacidúrias neutras	8
1.7. Cistinúria	9
1.7.1. Classificação da Cistinúria	10
1.7.2. Incidência e Prevalência	12
1.7.3. Patofisiologia	13
1.7.4. Diagnóstico diferencial de Cistinúria	14
1.7.5. Tratamento	16
1.7.6. Modelos animais	19
1.7.7. Genética	19
1.7.8. Objectivos	23
II - MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1. Doentes e amostras	27
2.2. Análise dos aminoácidos	29
2.2.1. Preparação da amostra	30
2.2.2. Cromatografia dos aminoácidos	30
2.3. Extracção de ácidos nucleicos	32
2.3.1. Extracção de DNA genómico	33
2.3.2. Extracção de RNA	33
2.4. PCR - Polymerase Chain Reaction	34
2.4.1. Amplificação selectiva dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	34
2.4.2. Controlo de qualidade interno	37
2.4.3. Critérios de aceitação do PCR de amplificação	37
2.4.4. Análise e Purificação dos Produtos de PCR amplificados	38
2.5. Sequenciação automática de fragmentos de DNA	38
2.5.1. Generalidades	38
2.5.2. PCR assimétrico	39

2.5.3.	Purificação dos produtos amplificados no PCR assimétrico	40
2.5.4.	Desnaturação e análise mutacional	40
2.6.	Análise do mRNA	40
2.6.1.	Síntese de cDNA	40
2.6.2.	A amplificação do cDNA	41
2.7.	Rastreio populacional	43
2.8.	Estudo de haplotipagem de SNPs	45
2.9.	Análise bioinformática	45
III-	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1.	Análise de aminoácidos	49
3.2.	Classificação dos doentes com cistinúria	50
3.3.	Estudo mutacional	57
3.3.1.	Resultados gerais da sequenciação	58
3.3.2.	Alterações não descritas na literatura	59
3.3.2.1.	Gene <i>SLC3A1</i>	59
3.3.2.1.1.	Alteração c.611-2A>C	59
3.3.2.1.2.	Alteração c.1136+44G>A	60
3.3.2.1.3.	Alteração c.1190A>G (p.Y397C)	61
3.3.2.1.4.	Alteração c.1597T>A (p.Y533N)	63
3.3.2.1.5.	Alteração c.*70A>G	64
3.3.2.2.	Gene <i>SLC7A9</i>	64
3.3.2.2.1.	Alteração c.216C>T (p.C72C)	65
3.3.2.2.2.	Alteração c.1119G>A (p.S373S)	65
3.3.2.2.3.	Alteração c.*82C>T	66
3.3.3.	Alterações descritas na literatura	66
3.3.3.1.	Investigação da variação c.972G>A (p.A324A)	67
3.4.	Caracterização das famílias com cistinúria	69
3.4.1.	Família A	69
3.4.2.	Família B	70
3.4.3.	Família C	71
3.4.4.	Família D	71
3.4.5.	Família E	73
3.4.6.	Família F	73

3.4.7.	Família G	74
3.4.8.	Família H	75
3.4.9.	Família I	76
3.4.10.	Família J	77
3.4.11.	Família K	78
3.4.12.	Família L	80
3.5.	Classificação bioquímica <i>versus</i> classificação molecular	80

IV - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	85
--	----

V - BIBLIOGRAFIA	91
------------------	----

VI - ANEXOS	99
-------------	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - a) Fórmula estrutural geral dos α -aminoácidos. b) As proteínas são cadeias de resíduos de aminoácidos ligados entre si por ligações covalentes designadas de ligações peptídicas	4
Figura 1.2 – Localização do sistema de transporte rBAT/b ⁰⁺ , responsável pela reabsorção renal de cistina.....	7
Figura 1.3 - Representação esquemática do transportador de aminoácidos.....	8
Figura 1.4 - a) Representação esquemática da estrutura dos diversos tipos de cristais envolvidos na formação de cálculos; b) imagem microscópica dos cristais de cistina; c) fotografia de 4 cálculos de cistina.	15
Figura 1.5 – Diagrama representativo da abordagem terapêutica na cistinúria.	18
Figura 1.6 - Representação esquemática do transportador, exibindo as duas subunidades codificadas por genes distintos	20
Figura 1.7 - Cromossoma 2 e <i>locus</i> do gene <i>SLC3A1</i>	20
Figura 1.8 - Cromossoma 19 e <i>locus</i> do gene <i>SLC7A9</i>	21
Figura 2.1 - Esquema representativo de um cromatógrafo para análise de aminoácidos.	29
Figura 3.1 - Cromatograma dos aminoácidos urinários de a) um controlo normal. b) de um doente com cistinúria, exibindo uma excreção aumentada de cistina e aminoácidos básicos (ornitina, lisina e arginina).	49
Figura 3.2 - <i>Ratios</i> entre a concentração de glicina (Gly), cistina (Cys), ornitina (Orn), lisina (Lys) e arginina (Arg) e o valor médio da população de referência. Para 10 dos casos index (D1). PN – População normal (valor calculado com 100 controlos).	56
Figura 3.3 - <i>Ratios</i> da concentração de cistina (Cys), ornitina (Orn), lisina (Lys) e arginina (Arg) e o valor médio da população de referência. Para 12 progenitores. PN – População normal (valor calculado com 100 controlos).	56
Figura 3.4 - <i>Ratios</i> da concentração de glicina (Gly), cistina (Cys), ornitina (Orn), lisina (Lys) e arginina (Arg) e o valor médio da população de referência. Para 8 familiares (D2, D3, D4, D5). PN – População normal (valor calculado com 100 controlos).	57
Figura 3.5 - Representação parcial da sequenciação do gDNA (a) normal e (b1) com a mutação c.611-2A>C no intrão 3 (b2) com a mutação c.611-2A>C sequenciado na cadeia complementar para melhor visualização da heterozigotia.	59
Figura 3.6 - Curva de <i>melting</i> obtida na metodologia hrMCA.	59
Figura 3.7 - Representação esquemática do <i>skipping</i> do exão 3 causado pela presença da alteração c.611-2A>C.	60
Figura 3.8 - Representação parcial da sequenciação do gDNA (a) normal e (b) com a alteração c.1136+44G>A.	60
Figura 3.9 - Representação parcial da sequenciação do gDNA (a) normal e (b) em heterozigotia para a mutação c.1190A> G (p.Y397C).	61
Figura 3.10 - Alinhamentos de parte da sequência da proteína rBAT humana com as sequências de outros organismos, em torno da mutação p.Y397C.....	61

Figura 3.11 - Representação parcial da sequenciação do gDNA (a) normal e (b) e com a mutação c.1597T>A (p.Y533N) em homozigotia.	63
Figura 3.12 - Alinhamentos de parte da sequência da proteína b ^o +AT humana, com as sequências de outros organismos, em torno da mutação Y533N.	63
Figura 3.13 - Representação parcial da sequenciação do gDNA (a) normal e (b) e com a alteração c.*70A>G em heterozigotia.	64
Figura 3.14 - Representação parcial da sequência do gDNA de uma amostra (a) normal e de (b) outra com heterozigotia para a alteração c.216C>T (p.C72C).	65
Figura 3.15 - Representação parcial da sequência do gDNA (a) normal (b) e com a alteração c.1119G>A (p.S373S) em heterozigotia.	65
Figura 3.16 - Representação parcial da sequência do gDNA (a) normal (b) e com a alteração c.*82C>T em heterozigotia.	66
Figura 3.17 - Mutação c.972G>A (p.A324A)..	68
Figura 3.18 –Contexto associado à alteração p.A324A, na sequência normal e mutada.....	68
Figura 3.19 - Haplótipos estabelecidos para os genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i> com base nas alterações de sequência encontradas na família D.....	72
Figura 3.20 - Haplótipos estabelecidos para ambos os genes com base nas alterações de sequência encontradas na família I.....	75
Figura 3.21 - Haplótipos estabelecidos para o gene <i>SLC7A9</i> com base nas alterações de sequência encontradas na família J.....	78
Figura 3.22 - Haplótipos estabelecidos para o gene <i>SLC7A9</i> com base nas alterações de sequência encontradas na família K.....	79

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1 - Principais sistemas de transporte de aminoácidos encontrados nos rins e intestinos.	6
Quadro 1.2 - Resumo dos valores encontrados na literatura para a concentração de cistina urinária em diferentes grupos de indivíduos: população normal, doentes com cistinúria (homozigotos), heterozigotos tipo I e não I.	11
Quadro 1.3 - Prevalência / Incidência da cistinúria em várias populações.	13
Quadro 1.4 - Alterações descritas no gene <i>SLC3A1</i> na base de dados <i>HGMD</i>	21
Quadro 1.5 - Alterações descritas no gene <i>SLC7A9</i> na base de dados <i>HGMD</i>	22
Quadro 2.1 - Resumo da informação clínica relativa aos casos índice estudados disponível.	28
Quadro 2.2 - Valores de referência dos aminoácidos com interesse para o diagnóstico de cistinúria expressos em $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina.	32
Quadro 2.3 - Valores de referência dos aminoácidos com interesse para o diagnóstico de cistinúria expressos em $\mu\text{mol}/24$ horas.	32
Quadro 2.4 - <i>Primers</i> específicos para amplificação das regiões codificantes do gene <i>SLC3A1</i>	35
Quadro 2.5 - <i>Primers</i> específicos para amplificação das regiões codificantes do gene <i>SLC7A9</i>	36
Quadro 2.6 - Condições reaccionais para amplificação dos exões dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	37
Quadro 2.7 - Condições de programação do termociclador utilizadas na amplificação das zonas codificantes dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	37
Quadro 2.8 - Condições reaccionais para a reacção do PCR de sequenciação de todos os fragmentos.	39
Quadro 2.9 - Condições de programação do termociclador utilizadas na reacção do PCR de sequenciação.	39
Quadro 2.10 - <i>Primers</i> específicos para amplificação do cDNA do gene <i>SLC3A1</i>	42
Quadro 2.11 - <i>Primers</i> específicos para amplificação do cDNA do gene <i>SLC7A9</i>	42
Quadro 2.12 - Condições reaccionais para amplificação do cDNA dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	43
Quadro 2.13 - <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos fragmentos analisados nos estudos populacionais por PCR-HRM.	44
Quadro 2.14 - Condições reaccionais para amplificação dos fragmentos de DNA utilizados nos estudos populacionais por PCR HRM.	44
Quadro 2.15 - Programa utilizado no termociclador para a amplificação dos fragmentos analisados nos estudos populacionais por PCR-HRM.	45
Quadro 3.1 - Concentração de glicina, cistina, ornitina, lisina e arginina urinária dos doentes em estudo referente no controlo analítico mais recente.	51
Quadro 3.2 - Concentração de cistina, ornitina, lisina e arginina urinária nos progenitores dos doentes em estudo.	51

Quadro 3.3 - Classificação dos doentes em função do fenótipo bioquímico. (a) Classificação em função do fenótipo bioquímico. (b) Classificação em função da excreção dos progenitores. (c) Classificação em função do CIC. (d) Classificação em função do <i>ratio</i>	52
Quadro 3.4 - Valores máximos de R por grupo etário.	55
Quadro 3.5 - Alterações encontradas no decurso deste trabalho no gene <i>SLC3A1</i>	58
Quadro 3.6 - Alterações encontradas neste trabalho no gene <i>SLC7A9</i>	58
Quadro 3.7 - Valores obtidos na previsão do impacto a nível funcional da mutação c.1190A>G (p.Y397C) através da aplicação dos programas <i>PolyPhen</i> e <i>SIFT</i>	62
Quadro 3.8 - Valores obtidos na previsão do impacto da mutação c.1597T>A (p.Y533N) para a função da proteína, através da aplicação dos programas <i>PolyPhen</i> e <i>SIFT</i>	64
Quadro 3.9 - Resultados obtidos na família A através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	69
Quadro 3.10 - Resultados obtidos na família B através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	70
Quadro 3.11 - Resultados obtidos na família C através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	70
Quadro 3.12 - Resultados obtidos na família D através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	71
Quadro 3.13 - Resultados obtidos na família E através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	73
Quadro 3.14 - Resultados obtidos na família F através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	73
Quadro 3.15 - Resultados obtidos na família G através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	74
Quadro 3.16 - Resultados obtidos na família H através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	75
Quadro 3.17 - Resultados obtidos na família I através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	76
Quadro 3.18 - Resultados obtidos na família J através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	77
Quadro 3.19 - Resultados obtidos na família K através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	78
Quadro 3.20 - Resultados obtidos na família L através da sequenciação dos genes <i>SLC3A1</i> e <i>SLC7A9</i>	80
Quadro 3.21 – Classificação bioquímica <i>versus</i> classificação molecular.	82
Quadro A1 - Os 20 aminoácidos que entram na composição das proteínas e respectiva classificação em função da natureza química das cadeias laterais	99
Quadro A2 - Doenças renais monogénicas envolvendo proteínas de transporte	100
Quadro A3 - Doenças renais monogénicas envolvendo proteínas de transporte	102
Quadro A4 - Condições do analisador de aminoácidos <i>Biochrom 30</i>	103
Quadro A5 - Valores retrospectivos dos aminoácidos cistina, ornitina, lisina e arginina, encontrados nos casos índice e familiares em estudo	104
Quadro A6 - Concentração dos aminoácidos publicados pelo ICC em 2001	107
Quadro A7 - Alterações encontradas no gene <i>SLC3A1</i> e respectiva codificação utilizada na construção de haplótipos	108

Quadro A8 - Alterações encontradas no gene <i>SLC7A9</i> e respectiva codificação utilizada na construção de haplótipos.....	109
---	-----

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(ddNTP [F])	- didesoxinucleótidos trifosfatos-fluorocromo
µm	- micrometro
µM	- micromolar
aa	- aminoácidos
AA ^o	- aminoácidos neutros
Abs	- absorvância
asc-1	- transportador de aminoácidos
B	- sequência nucleotídica de cadeia orientada de 3'-5' (<i>Reverse</i> ou <i>Back</i>)
b ^{o,+}	- sistema de transporte de cistina e aminoácidos básicos
b ^o AT	- subunidade leve do sistema de transporte de aminoácidos b ^{o,+}
<i>C2orf34</i>	- gene localizado no cromossoma dois
cDNA	- ácido desoxirribonucleico complementar ao mRNA
cDNA	- cadeia de DNA complementar ao mRNA
CIC	- Consórcio Internacional de Cistinúria
CO ₂	- dióxido de carbono
COOH	- carboxilo terminal (C-terminal)
D1	- código utilizado para identificação de casos índice
D2, D3,...	- código utilizado para identificação de outros membros da família que não sejam casos índice nem progenitores
ddNTP	- dideoxirribonucleico
del	- deleção
DEPC	- dietilpirocarbonato
DHM	- Doença Hereditária do Metabolismo
DMSA	- ácido dimercaptosuccinico
DNA	- ácido desoxirribonucleico
dNTP	- deoxiribonucleiótido trifosfato
dsDNA	- DNA de cadeia dupla (<i>double-stranded</i> DNA)
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EIM	- Erros Inatos do Metabolismo
<i>Ensembl genome</i>	- base de dados que contém informação relativa à sequenciação e à anotação dos genomas de vários organismos eucariotas
ESWL	- técnica utilizada para quebrar cálculos renais com ondas de choque extracorporais. Sinónimo de litotripsia
F	- sequência nucleotídica de cadeia orientada de 5'-3' (<i>Foward</i>)
F/A, F/B...	- código utilizado para identificação de famílias
gDNA	- DNA genómico
HATS	- transportador heteromérico de aminoácidos (Heteromeric Amino acid Transporter)
HCO ₃	- bicarbonato de sadio

HGMD	- base de dados das mutações descritas no genoma humano (<i>The Human Gene Mutation Database</i>)
HO-P	- iminoácido hidroxiprolina
HPLC	- cromatografia líquida de alta resolução
hrMCA	- técnica que utilize a análise das curvas de <i>melting</i> (<i>high resolution melting curve analysis</i>)
HRM-PCR	- técnica de PCR baseada na análise das curvas de <i>melting</i> (<i>high resolution melt</i>)
HSHAT	- subunidade pesada do transportador heteromérico de aminoácidos
IMINO	- sistema de transporte de iminoácidos
ins	- inserção
LAT	- Sistema L de transporte de aminoácidos
LSHAT	- subunidade leve do transportador heteromérico de aminoácidos
M/F...	- código utilizado para identificação do progenitor (mãe) de uma família
mA	- miliamperes
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
mmol	- milimolar
MPG	- mercaptopropionilglicina
mRNA	- RNA mensageiro
MS/MS	- espectrometria de massa em <i>tandem</i>
NAD(P)H	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase
ND	- não disponível
NH ₂	- amino-terminal (N-terminal)
nm	- nanómetros
nt	- nucleótido
OMIM	- base de dados das doenças mendelianas (<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>)
P/F...	- código utilizado para identificação do progenitor (pai) de uma família
PAT	- sistema de transporte de protões de aminoácidos
pb	- pares de bases
PCR	- reacção da polimerase em cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PM	- peso molecular
pmol	- picomolar
<i>PPM1B</i>	- gene que codifica a proteína magnésio dependente fosfatase 1B
<i>PREPL</i>	- gene que codifica uma proteína oligopeptidase
q-RT-PCR	- reacção da polimerase em cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) quantitativa por transcriptase reversa (reverse transcriptase)
R	- razão (<i>ratio</i>)
rBAT	- subunidade pesada do sistema de transporte de aminoácidos b ^{0,+}
Rmax	- razão do valor máximo
RNA	- ácido ribonucleico
RNase	- ribonuclease
rpm	- rotações por minuto
RT	- transcriptase reversa (reverse transcriptase)

SISLAB	- sistema integrado de <i>software</i> laboratorial
<i>SLC3A1</i>	- gene que codifica a subunidade rBAT do sistema de transporte apical apical b ^{0,+} de aminoácidos catiónicos
<i>SLC7A9</i>	- gene que codifica a subunidade b ⁰⁺ AT do sistema de transporte apical apical b ^{0,+} de aminoácidos catiónicos
SNPs	- polimorfismo (<i>Single nucleotide polymorfism</i>)
TAE	- tampão Tris-acetato-EDTA
TLC	- cromatografia em camada fina
T _m	- temperatura de <i>melting</i>
UTR	- região não traduzida do DNA
UV	- ultra-violeta
V _{24h}	- volume de urina de 24 horas
VMIR	- valor médio do intervalo de referência
VR	- valor de referência
γ-LAT	- Sistema γ ⁺ L de transporte de aminoácidos
β-A	- beta-alanina

I-INTRODUÇÃO

I-INTRODUÇÃO

1.1. Erros Inatos do Metabolismo - Generalidades

Foi na primeira década do século XX que Archibald E. Garrod, um conceituado médico inglês, utilizou pela primeira vez nos seus escritos a expressão “erros inatos de metabolismo” (Scriver, 2008).

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são alterações de natureza genética provocadas por um déficit enzimático que conduz ao bloqueio de uma determinada via metabólica¹.

Como consequência do bloqueio, há acumulação e/ou desvio do substrato para uma via metabólica alternativa, bem como, diminuição da síntese do produto da reacção. Por conseguinte, doentes portadores dessas anomalias podem apresentar elevadas concentrações de determinados metabolitos nos fluidos fisiológicos (Amâncio e Scalco, 2007).

Os EIM são considerados a causa das doenças hereditárias do metabolismo (DHM). São conhecidas mais de 500 DHM, e este número está constantemente a aumentar devido às novas técnicas utilizadas para identificação dos diversos fenótipos bioquímicos. De acordo com a bibliografia, os EIM representam cerca de 10% de todas as doenças genéticas. A incidência individual de cada doença metabólica é pequena, até porque se trata na maioria dos casos de patologias com hereditariedade autossómica recessiva. No entanto, embora raros, os cerca de 500 distúrbios conhecidos têm uma incidência conjunta estimada, entre 1:1000 e 1:5000 recém nascidos vivos (Amâncio e Scalco, 2007; Araújo, 2004; Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

O diagnóstico precoce destas doenças genéticas dinamizou e ampliou as perspectivas para o tratamento e aconselhamento genético reduzindo assim a taxa de morbidade e mortalidade, pelo que se tornou um foco de grande interesse social (Raghuveer *et al.*, 2006).

É de notar que o diagnóstico clínico das DHM é, por vezes, dificultado pelo seu enorme número, pela sua complexidade, variedade de sintomas clínicos, além da raridade.

¹ As vias metabólicas são séries de reacções consecutivas catalisadas por enzimas, que produzem determinados produtos que serão posteriormente utilizados pelo organismo (Donald Voet e Judith G. Voet, 2006).

A terapêutica adequada depende do EIM, do substrato não metabolizado responsável pelo desequilíbrio bioquímico e do quadro clínico do doente (Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

Seguidamente abordaremos alguns aspectos dos EIM de um grupo específico de moléculas: os aminoácidos.

1.2. Aminoácidos

Os α -aminoácidos são uma classe de compostos orgânicos, caracterizados pela presença de dois grupos funcionais: um carboxilo e um amina, ligados a um carbono central, ao qual também se ligam um átomo de hidrogénio e a uma cadeia lateral, cuja composição varia de aminoácido para aminoácido (figura 1.1).

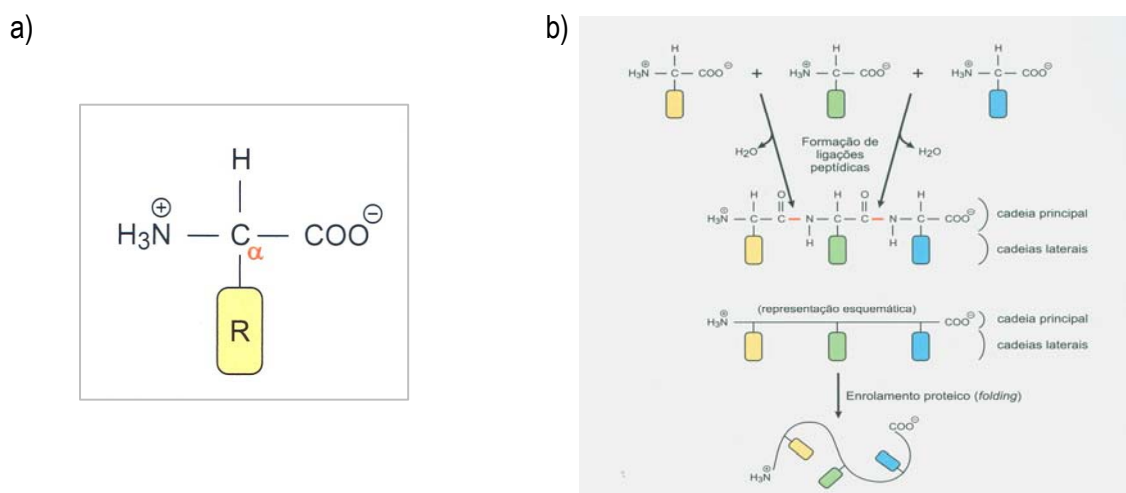


Figura 1.1 - a) Fórmula estrutural geral dos α -aminoácidos. Os diferentes grupos R permitem obter diferentes aminoácidos com características físico-químicas e fisiológicas distintas. b) As proteínas são cadeias de resíduos de aminoácidos ligados entre si por ligações covalentes designadas de ligações peptídicas (a vermelho). (Adaptado de: Horn, 2006; Ascenso e Quintas, 2008).

Estes compostos desempenham um papel central nos sistemas biológicos, sendo utilizados como blocos básicos para a biossíntese de proteínas, substratos intermediários metabólicos e mensageiros fisiológicos. Além dos vinte L-aminoácidos encontrados nas proteínas, há outros que não são componentes proteicos.

Os aminoácidos e seus derivados também desempenham papéis biológicos independentes como neurotransmissores e intermediários do metabolismo e contribuem, a nível físico-químico, para o pH, para a força iónica e para os potenciais eléctricos, osmóticos e redox dos sistemas biológicos (Ascenso e Quintas, 2008; Termignoni, 2006).

1.3. Classificação dos aminoácidos

Os aminoácidos são normalmente classificados de acordo com a polaridade das suas cadeias laterais (R), as quais estão ligadas ao átomo de carbono α , (figura 1.1). No anexo 1 (quadro A1) estão descritos os 20 aminoácidos que entram na composição das proteínas e respectiva classificação, de acordo com a nomenclatura referida: com **cadeias laterais apolares**, com **cadeias laterais polares sem carga** e com **cadeias laterais polares com carga** (Termignoni, 2006).

Os aminoácidos também podem ser classificados como neutros, ácidos e básicos, de acordo com a carga eléctrica que possuem em condições fisiológicas. Entre os **aminoácidos neutros**, alguns são apolares (alanina, valina, isoleucina, leucina, triptofano, metionina, fenilalanina) e outros são polares (serina, treonina, tirosina, glutamina, cisteína e asparagina). Os **aminoácidos ácidos** (ácido aspártico e ácido glutâmico) e **básicos** (lisina, ornitina, arginina e histidina) são polares e hidrofílicos. O aminoácido prolina é apolar (Stansfield *et al*, 1998).

1.4. Alterações no processamento celular dos aminoácidos

As **aminoacidopatias** são DHM caracterizadas por um défice enzimático - enzimopatia - no primeiro passo da via metabólica de degradação de um determinado aminoácido, levando à sua acumulação no organismo. Estas patologias são diagnosticadas a nível bioquímico, através do estudo dos perfis de aminoácidos dos líquidos biológicos.

A análise quantitativa dos aminoácidos pode ser realizada em analisadores específicos para estes compostos, que operam com base na cromatografia líquida de troca-iónica e revelação com ninidrina e que permitem separar, identificar e quantificar cerca de 40 aminoácidos e seus derivados. Este tipo de estudo pode também ser realizado por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) e por espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS), possibilitando neste caso, dada a sensibilidade da metodologia, a realização da análise em amostras de sangue seco impregnado em papel de filtro (cartão de *Guthrie*).

O estudo dos aminoácidos permite não só fazer o diagnóstico de aminoacidopatias, mas também, de alterações do seu transporte membranar e o controlo analítico periódico dos doentes em tratamento.

1.5. Absorção e reabsorção de aminoácidos

Os transportadores de aminoácidos são de natureza proteica e classificam-se em famílias de acordo com a sua função, homologia e propriedades funcionais.

A absorção de aminoácidos no intestino, e a sua reabsorção no rim, envolve distintos sistemas de transporte consoante os grupos de aminoácidos envolvidos (quadro 1.1) (Bröer, 2008).

Quadro 1.1 - Principais sistemas de transporte de aminoácidos encontrados nos rins e intestinos.

Sistema	cDNA	Gene	Aminoácidos transportados	Doença	Tecido
B⁰	B ⁰ AT1 B ⁰ AT2	<i>SLC6A19</i> <i>SLC6A15</i>	AA ⁰ P, L, V, I, M	Hartnup	rins, intestino delgado rins, cérebro
b^{0,+}	rBAT b ^{0,+} AT	<i>SLC3A1</i> <i>SLC7A9</i>	R, K, O, cistina	Cistinúria Cistinúria	rins, intestino delgado rins, intestino delgado
Gly	XT2	<i>SLC6A18</i>	G	Iminoglicinúria (candidato)	rins
IMINO	IMINO	<i>SLC6A20</i>	P, HO-P	Iminoglicinúria (candidato)	rins, intestino delgado, cérebro
PAT	PAT1 PAT2	<i>SLC36A1</i> <i>SLC36A2</i>	P, G, A, GABA, β-A P, G, A	Iminoglicinúria (candidatos)	rins, língua, coração ?

Legenda: AA⁰- aminoácidos neutros; HO-P - hidroxiprolina; β-A - beta-alanina; O - ornitina; P - prolina; L- leucina; V - valina; I - isoleucina; M - metionina; R - arginina; K - lisina; O - ornitina; G - glicina; A - alanina; GABA - ácido gama-aminobutírico. (Adaptado de: Bröer, 2008).

Nos adultos, em condições normais, as células epiteliais dos túbulos proximais renais reabsorvem 99% da cistina filtrada havendo dois mecanismos de transporte envolvidos: (i) um sistema de baixa afinidade, localizado no túbulo contornado proximal e que é exclusivo para o transporte de cistina e (ii) um sistema de alta afinidade, localizado na superfície das células epiteliais do lúmen do túbulo proximal (segmento S3) em que a cistina compartilha o seu transporte com os aminoácidos básicos (figura 1.2) (Biyani e Cartledge, 2006; Palacin *et al*, 2001).

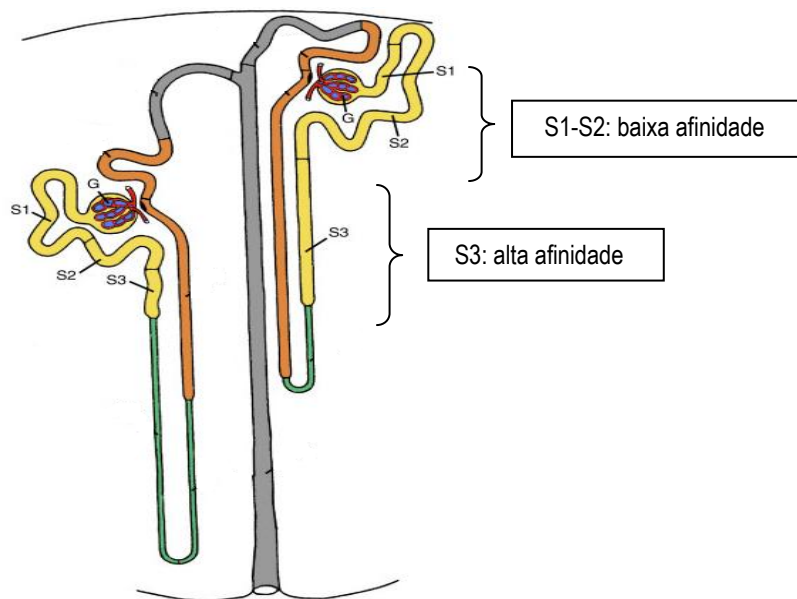


Figura 1.2 - Localização sistema de transporte rBAT/ $b^{0,+}$, responsável pela reabsorção renal de cistina. No segmento S1 e S2 há baixa afinidade para a cistina e alta capacidade de reabsorção e no segmento S3 há alta afinidade mas baixa capacidade de reabsorção. (Adaptado de: Raciti *et al*, 2008).

Os heterodímeros de rBAT com $b^{0,+}$ AT constituem o sistema responsável pelo transporte de cistina e sua absorção no intestino delgado e reabsorção deste aminoácido no túbulo contornado proximal. Estas unidades estão integradas na família de transportadores heteroméricos de aminoácidos (HATS). A unidade funcional deste sistema de transporte é composta por duas subunidades: uma pesada (HSHAT) (rBAT) e uma leve (LSHAT) ($b^{0,+}$), unidas entre si por uma ponte dissulfeto (figura 1.3). As cadeias pesadas são glicoproteínas de membrana com só um domínio transmembranar e com as extremidades NH_2 intracelular e a $COOH$ extracelular. As cadeias leves são hidrofóbicas, não estão glicosiladas, têm 12 domínios transmembranares e as extremidades têm localização intracelular. Estas duas subunidades estão ligadas por uma ponte dissulfureto, num domínio extracelular. A cadeia leve ($b^{0,+}$) fixa-se à membrana, apenas quando pode interagir com a subunidade pesada (rBAT), para que se dê a conformação proteica adequada.

A expressão das duas subunidades é necessária para a expressão do sistema de transporte na superfície celular (Palacín *et al*, 2005; Scriver, 2008).

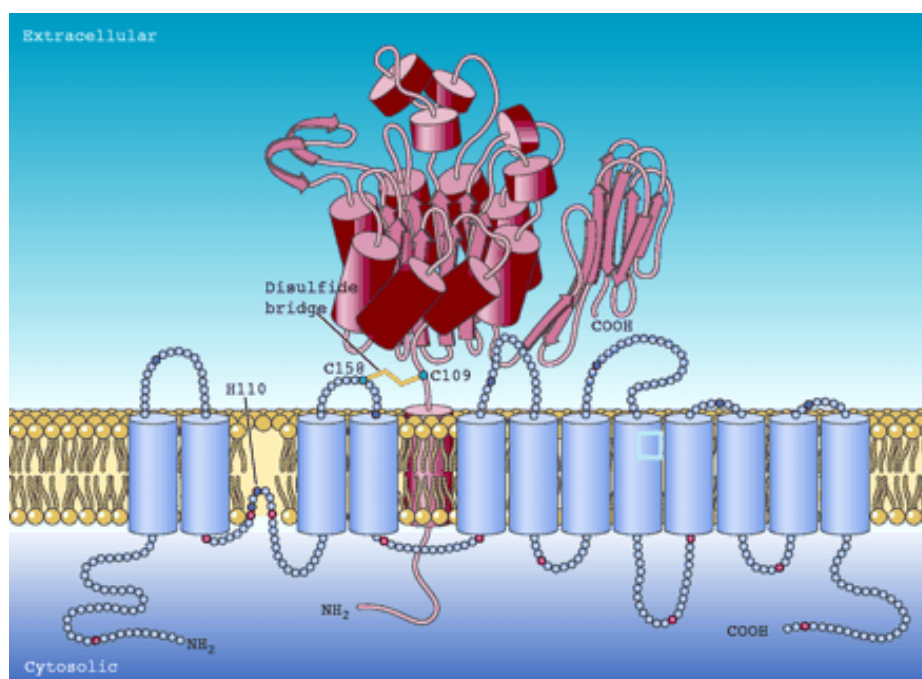


Figura 1.3 - Representação esquemática do transportador de aminoácidos: subunidade pesada (rosa), codificada pelo gene *SLC3A1*, e subunidade leve (azul), codificada pelo gene *SLC7A9*, unidas por uma ponte dissulfeto (amarela). (Retirado de: Palacin *et al*, 2005).

1.6. Aminoacidúrias neutras

Muitas doenças renais têm uma componente genética tendo já sido identificados diversos genes envolvidos. Sabe-se que muitos destes genes codificam proteínas de transporte (anexo 2 - quadro A2).

A clonagem e identificação dos transportadores de aminoácidos neutros, veio trazer novos conhecimentos sobre as aminoacidúrias hereditárias (patologias em que existe um aumento da excreção urinária de determinados aminoácidos), nomeadamente na doença de Hartnup, iminoglicinúria e cistinúria.

Doença de Hartnup

A doença de Hartnup (OMIM 234500) envolve os transportadores de aminoácidos a nível intestinal e renal e é caracterizada por uma aminoacidúria, que afecta a excreção urinária de todos os aminoácidos neutros, com excepção do iminoácido prolina (Bröer, 2008). Foi descrita pela primeira vez em 1956 em dois irmãos de uma família original de Hartnup, os quais deram entrada no hospital com ataxia cerebelar, tremores, nistagmo, erupção cutânea e atraso de desenvolvimento. Nesta patologia, observam-se

frequentemente sintomas de pelagra (deficiência em niacina e/ou aminoácidos essenciais), que é causada, provavelmente, pela perda de triptofano, dado que cerca de metade do NAD(P)H sintetizado nos tecidos humanos ocorre através do triptofano, e por conseguinte a carência neste aminoácido e em niacina têm sintomatologia semelhante (Broer *et al*, 2006).

Iminoglicinúria

A Iminoglicinúria (OMIM 242600) é uma doença autossómica recessiva, caracterizada pelo aumento da excreção urinária do iminoácido prolina, e de glicina. É um distúrbio benigno, com um fenótipo complexo.

Estudos realizados em várias famílias sugerem a existência de três tipos diferentes de iminoglicinúria:

- renal, combinada com um defeito de reabsorção intestinal (em que os heterozigotos são normais),
- renal sem fenótipo intestinal (em que os heterozigotos são normais),
- renal sem fenótipo intestinal (os heterozigotos apresentam glicinúria).

Apesar de se poder considerar possível o envolvimento de três genes nos três tipos de iminoglicinúria, poderão ser somente dois a gerar os três fenótipos distintos tal como se observa na cistinúria (Broer *et al*, 2006).

A cistinúria é o terceiro tipo de aminoacidúria neutra e será objecto de maior desenvolvimento nas secções seguintes, uma vez que é o tema principal deste trabalho.

1.7. Cistinúria

A cistinúria (OMIM 220100) foi referida pela primeira vez em 1908 por Garrot. É uma patologia que afecta a absorção de cistina e aminoácidos catiónicos no intestino e rins. Esta doença hereditária autossómica recessiva é caracterizada pelo aumento da excreção urinária de cistina e de aminoácidos básicos (lisina, arginina e ornitina). Os cálculos de cistina constituem 1-2% dos cálculos urinários e 6-8% dos cálculos pediátricos (Ahmed *et al*, 2006).

A patologia é causada por um defeito no(s) mecanismo(s) de transporte luminal partilhado por estes aminoácidos nas células epiteliais dos túbulos renais e do tracto gastrointestinal. Esta situação conduz à baixa reabsorção do aminoácido cistina pelas células dos túbulos renais proximais. A expressão do défice de transporte a nível

intestinal não tem consequências clínicas, uma vez que a má-absorção destes aminoácidos é compensada pela absorção de oligopeptídeos que permanece intacta, mas a nível renal, os aminoácidos filtrados no glomérulo são fracamente reabsorvidos no túbulo o que conduz à sua hiperexcreção urinária. As concentrações elevadas de arginina, lisina e ornitina na urina não têm tradução clínica, no entanto a cistina, devido à sua baixa solubilidade, precipita nos túbulos renais constituindo uma das causas de nefrolitíase (Palacín *et al*, 2001; Scriver, 2008; Knoll *et al*, 2005; Bröer, 2008; Fernández *et al*, 1997).

1.7.1. Classificação da Cistinúria

Existem várias formas de classificação dos casos de cistinúria.

Alguns autores baseiam-se na excreção urinária de cistina e de aminoácidos básicos nos heterozigotos obrigatórios (portadores), e no fenótipo apresentado. Neste tipo de classificação distinguem-se três tipos de cistinúria:

- (i) tipo I , com portadores silenciosos e só os homozigotos formam cálculos,
- (ii) tipo II, em que os portadores apresentam excreção elevada de cistina e podem formar cálculos,
- (iii) tipo III , em que os portadores têm excreção moderada de cistina e podem formar cálculos. Neste tipo de cistinúria, a reabsorção de cistina intestinal não está completamente comprometida. (Nakagawa e Coe, 1999; Biyani e Cartledge, 2006; Leclerc *et al*, 2001; Guillén *et al*, 1999).

De acordo com alguns autores, em contraste com os homozigotos do tipo I e II, os homozigotos do tipo III têm níveis de cistina plasmática mais elevados em circulação, após sobrecarga oral deste aminoácido pelo que é possível detectá-los pelo tipo de aminoacidúria e concentração de cistina no sangue (Calonge *et al*, 1995; Bisceglia *et al*, 1997; Pras *et al*, 1999).

Uma forma de distinguir os heterozigotos é através da soma da excreção de cistina com os aminoácidos básicos. Se a soma destes aminoácidos for superior aos valores de referência na população em estudo, os progenitores dos homozigotos devem ser classificados como heterozigotos tipo II ou tipo III. Como a excreção urinária de aminoácidos por estes heterozigotos nem sempre é linear e concordante com o descrito na literatura, nem sempre é possível fazer a separação entre estes dois tipos de cistinúria. Uma ideia defendida por alguns autores é de que a excreção de lisina é o

melhor marcador para distinguir os heterozigotos tipo II e III da população normal, porque a sua excreção é sempre superior ao intervalo de referência (Guillén *et al*, 1999).

Mais recentemente, após a associação da cistinúria tipo I ao *locus* do gene *SLC3A1* no cromossoma 2p16.3 e da cistinúria tipo II e III ao *locus* de outro gene (*SLC7A9*) no cromossoma 19q13.1 (Calonge *et al*, 1995; Bisceglia *et al*, 1997), Feliubadaló e colaboradores, reforçaram a ideia, que já vinha a ser proposta, de que as cistinúrias do tipo II e III devem ser consideradas juntas e designadas como não-tipo I (Feliubadaló *et al*, 1999). Os homozigotos quer do tipo I quer não-I apresentam hiperexcreção de cistina com ordem de grandeza semelhante (quadro 1.2) (Botzenhart *et al*, 2002).

Quadro 1.2 - Resumo dos valores encontrados na literatura para a concentração de cistina urinária em diferentes grupos de indivíduos: população normal, doentes com cistinúria (homozigotos), heterozigotos tipo I e não I.

Grupo	Concentração de cistina urinária
População normal	< 30 mg/dia (0.13 mmol/dia) ⁽¹⁾ 0-100 µmol /g creatinina ⁽¹⁾
Homozigotia para a cistinúria (formam cálculos)	> 400 mg/dia (1.7 mmol/dia) ⁽²⁾ > 1.000 µmol /g creatinina ⁽³⁾ ou >1.300 µmol /g creatinina ^{(4)*} > 113.12 µmol cistina/mmol creatinina ⁽³⁾ ou >150 µmol/mmol creatinina ^{(4)*}
Heterozigotos tipo I (não formam cálculos)	< 200 mg/dia (0.8 mmol/dia) ⁽¹⁾ 0-100 µmol /g creatinina ⁽¹⁾
Heterozigotos tipo II e III (não-I) (podem formar cálculos)	200-400 mg/dia (0.8 -1.7 mmol/dia) ⁽¹⁾ 990-1.740 e 100-600 µmol /g creatinina ⁽¹⁾

Legenda: ⁽¹⁾ Valores de excreção de cistina referentes a crianças e adolescentes. (Adaptado de: (1) Biyani *et al*, 2006; (2) Leclerc *et al*, 2001; (3) Guillén *et al*, 1999; (4) Knoll *et al*, 2005).

Os casos de cistinúria poderão dividir-se ainda em:

- *Tipo I*, com hereditariedade autossômica recessiva, em que ambos os progenitores do caso índice têm uma excreção urinária de aminoácidos normal.
- *Tipo não-I*, com hereditariedade autossômica dominante com penetrância incompleta, quando os progenitores do doente exibem excreção urinária moderada a alta de cistina (Calonge *et al*, 1995).

- *Tipo misto* quando a excreção urinária de um dos progenitores é elevada e a de outro é normal (Nakagawa *et al*, 1999; Biyani e Cartledge, 2006; Leclerc *et al*, 2001; Guillén *et al*, 1999).
- “*Indefinido*”, quando não é possível avaliar um ou ambos os progenitores (Dello Strologo *et al*, 2002).

Há ainda a referir a *cistinúria transitória neonatal*, descrita pela primeira vez por Scriver *et al* em 1985, em crianças heterozigóticas para cistinúria (Palacin *et al*, 2001). Em 2005 Boutros *et al*, também a descreveram em indivíduos que apresentavam diversas combinações alélicas. Estes doentes apresentavam um decréscimo progressivo nos níveis de cistina urinária desde o período neonatal até aos 2-3 anos de idade. Este fenómeno era mais evidente nos indivíduos tipo III/N, tendo sido observados casos de crianças em que a média urinária de cistina descia de cerca de 3621 $\mu\text{mol/g}$ creatinina aos 1-2 meses para aproximadamente 318 $\mu\text{mol/g}$ creatinina aos 4 anos, correspondendo a um aumento da maturidade do sistema de transporte (Yuen *et al*, 2006).

1.7.2. Incidência e Prevalência ²

Quando tentamos analisar a incidência/prevalência* da cistinúria, verificamos que a bibliografia existente não é suficientemente explícita em relação a estes conceitos, notando-se alguma confusão na aplicação dos mesmos.

A incidência global na população é de 1/7.000 com uma variação generalizada que pode oscilar entre 1/2.500 e 1/15.000 dependendo do conceito de cistinúria adoptado e do método de rastreio utilizado para a sua detecção, da etnia e da origem geográfica das populações estudadas. No entanto, todos os programas apontam a cistinúria tipo I como sendo a forma clássica da patologia, representando 60% dos casos (Palacín *et al*, 2001, Nakagawa e Coe, 1999; Saudubray *et al*, 2006).

Algumas das abordagens apresentam limitações significativas. Por exemplo, o método do nitroprussiato dá origem a falsos positivos e os programas de *screening* neonatal urinários baseados na análise quantitativa da cistina, dão origem a uma incidência falsamente aumentada da doença, uma vez que também detectam situações

² ***Prevalência:** nº total ou proporção de casos existentes numa determinada **população** e num **determinado momento** temporal. Permite compreender o quanto é comum, ou rara, uma determinada doença numa população. Com este objectivo é preferível o uso de valores em proporção, mas convém referir a dimensão da população a que se refere.

***Incidência:** nº ou proporção de novos casos surgidos numa determinada população e **num determinado intervalo de tempo** (Pereira, 2007).

de imaturidade tubular renal existente no período neonatal e que cursam com o aumento transitório da excreção urinária de cistina (Palacín *et al*, 2001). No quadro 1.3 sumarizam-se os resultados de alguns estudos realizados em diferentes populações.

Quadro 1.3 - Prevalência / Incidência da cistinúria em várias populações.

País/ População	Prevalência/Incidência	Referência bibliográfica	Observações
Inglaterra	1/2 000	1; 2; 5	Rastreio neonatal
Judeus Israelitas da Libânia	1/2 500 1/2 500	1; 2; 3; 4; 5	Rastreio neonatal
Austrália	1/4 000	1; 2; 5	Rastreio neonatal
Estados Unidos	1/1 000-17 000	1; 2; 4	Rastreio neonatal
Valência	1/1 887	1; 2	Estudo de aa (HPLC)
Quebec	1/7 200	1	Rastreio neonatal
Suécia	1/ 100 000	1; 4; 5	Metodologia Indefinida
Japão	1/18 000	5	Metodologia Indefinida
França	1/20 000 (incidência dos homozigotos)	6	Metodologia Indefinida
Turquia (Eskisehir)	1/2 065	7	Teste de Brand; Estudo dos aa
Canadá	1/12 500	7	Metodologia Indefinida

Legenda: **1** - Palacín *et al*, 2001; **2** - Guillén *et al*, 1999; **3** - Iraola e Langman, 2006; **4** - Knoll *et al*, 2005; **5** - Biyani *et al*, 2006; **6** - Jungers *et al*, 2008; **7** - Aydogdu *et al*, 2009; **aa** - aminoácidos.

1.7.3. Patofisiologia

A cistinúria está clinicamente associada a urolitíase. Dada a elevada concentração de cistina no filtrado glomerular (que não é reabsorvida), e a sua baixa solubilidade na urina a pH fisiológico, ocorre a sua precipitação nos túbulos renais, levando à formação de cálculos. O pH ácido e o fluxo urinário obstruído, ou alterado, reduzem ainda mais a solubilidade da cistina (Biyani e Cartledge, 2006).

A cistina é significativamente mais solúvel a pH alcalino: a pH 7 a sua solubilidade é de aproximadamente 250 mg/L de urina, contudo para valores superiores, 7,5 e 8 este valor duplica e triplica, respectivamente (Saudubry *et al*, 2006).

A composição iónica da urina é outro factor que tem um impacto sobre a solubilidade da cistina. O aumento da força iónica de uma solução de 0.005 para 0.3 permite um aumento da absorção adicional, em cerca de 70 mg de cistina por litro de solução. É também de salientar que a natureza dos compostos electrolíticos desta solução iónica é importante. Por exemplo, o cloreto de cálcio aumenta a solubilidade da cistina quando comparado com os cloretos de magnésio ou de sódio (Biyani e Cartledge, 2006).

A incidência da cistinúria é igual em ambos os sexos, mas os homens apresentam fenótipos mais graves, o que tem sido associado à anatomia das vias urinárias (Fernández e Armentia, 1997).

Apesar do pico para o aparecimento de cálculos ser a segunda década de vida, cerca de 25% dos cistinúricos desenvolvem cálculos na primeira década e 30-40 % dos doentes têm a sua primeira crise mais precocemente nos primeiros anos de vida (Biyani e Cartledge, 2006).

1.7.4. Diagnóstico diferencial de Cistinúria

A litíase renal e a doença renal crónica são situações clínicas comuns que atingem, respectivamente, 5 e 13% da população adulta. A doença renal crónica pode surgir (como uma complicação secundária à formação de cálculos provocados por doenças hereditárias, como por exemplo a hiperoxalúria, a doença de Dent, a hiperexcreção de 2-8-hidroxiadenina e a cistinúria), uma vez que a deposição de cristais a nível renal pode conduzir à baixa taxa de filtração glomerular e à doença renal crónica ou terminal (Rule *et al*, 2009).

Os cálculos renais mais comuns são os de oxalato de cálcio, representando 80% da globalidade dos cálculos e 40% dos encontrados nas crianças com nefrolitíase (Coe *et al*, 2005; Acar *et al*, 2008).

As litíases renais hereditárias, de transmissão monogénica ou digénica, que dependem unicamente de factores genéticos, são bastante mais raras que as litíases cálcicas ou úricas, que são na maioria das vezes resultantes de processos multifactoriais (Jungers *et al*, 2008).

A cistinúria representa cerca de 77% do total das litíases genéticas e mais de 80% dos casos observados nos adultos. Os sintomas clínicos da doença são

semelhantes a outras causas metabólicas que também dão origem a cálculos renais (anexo 3 – quadro A3).

Como os cálculos podem ter diferente composição (figura 1.4a) a sua análise deve ser realizada, sempre que possível (Knoll *et al*, 2005). Não obstante, a suspeita de cistinúria é elevada se os sintomas iniciais surgirem na primeira ou segunda décadas de vida, a formação de cálculos for recorrente, houver história familiar de litíase renal e se a análise microscópica do sedimento urinário de uma micção recente revelar cristais de cistina hexagonais típicos (figura 1.4b) (Biyani e Cartledge, 2006, Knoll *et al*, 2005; Peres e Largura, 2008).

Tal como os demais cálculos renais, os de cistina (figura 1.4c) são de fácil diagnóstico por ultrasonografia e são pouco rádio-opacos aos raios-X (devido ao seu conteúdo em enxofre), sendo também facilmente detectáveis por espectroscopia.

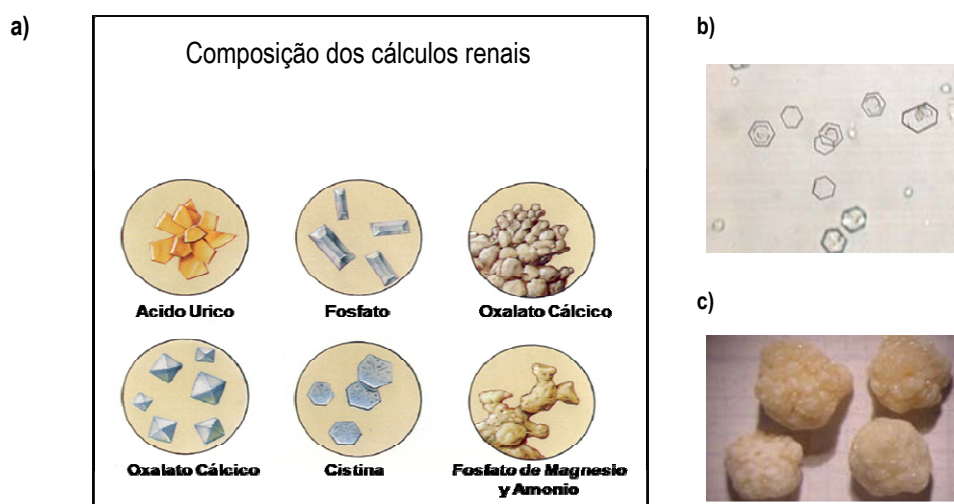


Figura 1.4 - a) Representação esquemática da estrutura dos diversos tipos de cristais envolvidos na formação de cálculos; b) imagem microscópica dos cristais de cistina; c) fotografia de 4 cálculos de cistina. (Adaptado de: <http://www.unidadurologia.com/portal/ficheros/rinon15.png>).

Os cristais de cistina são observados em apenas 20-25% dos doentes cistinúricos e como o diagnóstico não pode ser excluído pela sua ausência, é necessário realizar testes adicionais para a clarificação da situação clínica. O teste de nitroprussiato de sódio, ou teste de Brand, apesar de constituir um método rápido de pesquisa de concentrações anormais de cistina (detecta concentrações superiores a 75 mg cistina/L), não é actualmente utilizado por não ser quantitativo e dar resultados falsamente positivos (nomeadamente na presença de cetonúria, de outros aminoácidos como a homocistina e de alguns metabolitos medicamentosos). Efectivamente este método utilizado no passado para detectar doentes cistinúricos homozigóticos está actualmente em desuso.

A cromatografia em camada fina (TLC) pode também ser utilizada com a mesma finalidade (Biyani e Cartledge, 2006; Knoll *et al*, 2005).

O diagnóstico final é feito por cromatografia líquida de troca-iónica com quantificação dos aminoácidos cistina, lisina, ornitina e arginina na urina. Há estudos que enfatizam o potencial do HPLC com o uso de uma pré-coluna de derivatização na análise de aminoácidos (Guillén *et al*, 1999). Mais recentemente, outros métodos, como a espectrometria de massa, também foram descritos.

É de salientar que a frequência dos cálculos renais não se correlaciona com a excreção urinária de qualquer um dos aminoácidos considerados ou com a combinação de aminoácidos básicos e cistina.

A colheita de urina de 24 horas, embora seja problemática nas crianças, é necessária para decidir sobre um novo tratamento e para fazer o controlo periódico, pois os doentes que excretam mais de 1300 $\mu\text{mol/g}$ creatinina (150 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de creatinina) de cistina são clinicamente considerados homocigóticos e necessitam de efectuar tratamento e respectivos controlos periódicos (Knoll *et al*, 2005). Os diferentes tipos de homocigotos podem ser diferenciados recorrendo ao estudo familiar (Fernández e Armentia, 1997).

A colheita de urina para análise deve obedecer a determinados requisitos de modo a evitar valores falsamente baixos de cistina na amostra, pelo que é aconselhável promover a solubilização da cistina com a adição de bicarbonato de sódio até $\text{pH} > 7.5$. Se a colheita de urina de 24 horas não for possível, a razão entre cistina/creatinina numa amostra aleatória de urina pode ser informativa e nalguns casos permite fazer a distinção entre os homocigotos (ou compostos heterocigotos) e os portadores (heterocigotos). Além disso, pode permitir o acompanhamento eficaz da estratégia de tratamento (Knoll *et al*, 2005).

O recurso a estudos moleculares é a etapa final: a identificação das mutações responsáveis pela patologia permite a confirmação do diagnóstico em definitivo (Peres e Largura, 2008).

1.7.5. Tratamento

O primeiro objectivo do tratamento, quer nas crianças quer nos adultos, é aumentar a solubilidade da cistina urinária, de modo a prevenir a formação de novos cálculos e dissolver os existentes. Assim sendo, o tratamento de todos os doentes inclui: i) um aumento na ingestão de fluídos, ii) uma dieta com baixo teor em sal e iii) alcalinização da urina (Ahmed *et al*, 2006).

Uma vez que a metionina é metabolizada a cistina no organismo, uma redução na ingestão de metionina (encontrada em alimentos ricos em proteínas), pode reduzir a excreção urinária de cistina. Infelizmente a restrição dietética não é bem aceite por muitos doentes (Saudubray *et al*, 2006).

O factor mais importante do tratamento é por conseguinte o aumento da ingestão de fluidos, que tem um papel preponderante na redução da concentração da cistina urinária. Consegue-se prevenir os cálculos recorrentes em cerca de um terço dos doentes apenas com a hidratação. A ingestão de líquidos, deve ser no mínimo de 3 litros por dia nas crianças e cerca de 4-5 litros nos adultos (teoricamente, deve ser bebido 1 litro de água por cada milimole de cistina excretada). É importante que o doente não tome apenas bebidas ao longo do dia mas que também assegure a diurese ao longo da noite. Para garantir a noctúria, o doente deve beber antes de ir para a cama e também durante a noite após as micções (Knoll *et al*, 2005). O sucesso da hidratação pode ser monitorizado pelo próprio doente através do registo da densidade da urina usando tiras de medição de Nitrazina. A meta a atingir é a obtenção de um valor igual ou inferior a 1,010 (Jungers *et al*, 2008).

Como já foi referido, a cistina é muito mais solúvel a pH alcalino pelo que a alcalinização da urina deve ser mantida (500mg/l a pH 7.5 e cerca de 250mg/l a pH 7.0). As bebidas alcalinizantes ricas em bicarbonato e com baixo teor em sódio (1500 mg HCO₃/L, máximo 500 mg de sódio/L) podem ser benéficas (chás, sumos citricos e água mineral) (Saudubray *et al*, 2006).

O uso preventivo de ácido ascórbico nas crianças, foi referido pela primeira vez em 1983. É um composto capaz de reduzir a cistina a cisteína quando administrado em altas doses, no entanto a sua utilização no tratamento da cistinúria é polémica porque pode incrementar a concentração urinária de oxalatos (Knoll *et al*, 2005).

O fracasso nas medidas anteriores implica o recurso ao tratamento com compostos sulfidrilos ou quelantes (D-penicilamina, α -mercaptopropionilglicina ou o captopril), que reduzem a cistina a dissulfitos mistos que são mais solúveis (figura 1.5). O controlo regular é muito importante para monitorizar o tratamento, a função renal e detectar atempadamente o aparecimento de cálculos (Knoll *et al*, 2005; Saudubray *et al*, 2006).

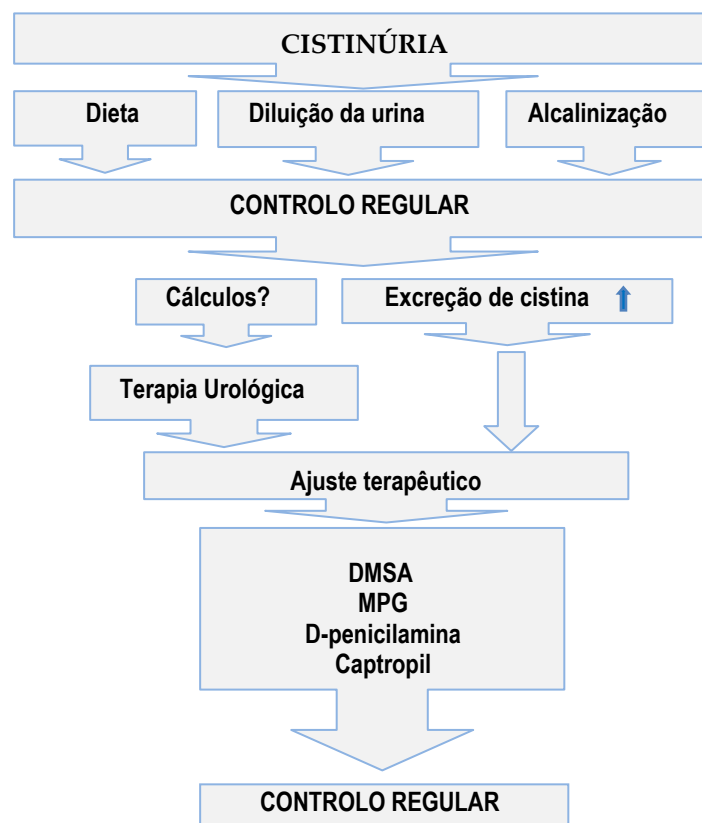


Figura 1.5 - Diagrama representativo da abordagem terapêutica na cistinúria. Nos doentes com cistinúria, a primeira linha de tratamento consiste no incremento no consumo de líquidos, dieta pobre em sal e a alcalinização da urina. Outras medidas terapêuticas são adoptadas nos casos que não respondem favoravelmente a estas medidas. (Adaptado de: Knoll *et al*, 2005).

É de salientar que o uso destes medicamentos pode provocar reacções adversas por vezes mal toleradas pelos doentes. A D-penicilamina, por exemplo, é normalmente bem tolerada pela maioria dos doentes mas pode causar reacções de hipersensibilidade, problemas renais e síndromas auto-ímmunes. A mercaptopropionilglicina (MPG, tiopronin) tem também alguns efeitos adversos, podendo provocar glomerulopatia ou hiperlipedemia. O captopril é o medicamento mais recomendado por alguns autores, principalmente em doentes que também exibam hipertensão, contudo a sua eficácia é questionável (Ahmed *et al*, 2006; Saudubray *et al*, 2006).

Em 2003, Parvex e colaboradores, fizeram testes *in vitro* para comparar a eficácia dos vários agentes terapêuticos utilizados no tratamento da cistinúria. A D-penicilamina, a mercaptopropionilglicina e o captopril, foram comparados com um novo agente terapêutico “potencial”: o ácido dimercaptossuccínico (DMSA). Concluíram que os dois compostos mais eficazes eram o DMSA e a D-penicilamina. O MPG tem um efeito intermédio, sendo rapidamente excretado na urina em concentrações suficientes para

inibir a precipitação de cistina, e o captopril é um fraco inibidor que requer grandes doses para ser eficaz (Parvex *et al*, 2003).

Outras intervenções terapêuticas, como o recurso à cirurgia urológica, estão reservadas para doentes que não respondem a estas medidas. Muitos doentes progridem para a insuficiência renal resultante da formação de cristais e dos procedimentos cirúrgicos recorrentes, uma vez que a formação e crescimento dos cálculos é rápida. (ESWL) (Evan *et al*, 2006; Peres e Largura, 2008).

1.7.6. Modelos animais

Em 2003 Feliubalo e Peters descreveram o uso de ratinhos transgênicos no estudo da cistinúria.

Em 2007 Font-Llitjós *et al* testaram o tratamento com D-penicilamina nestes ratinhos e concluíram que constituem um modelo animal apropriado para testar novas drogas para o tratamento deste tipo de urolitíase.

1.7.7. Genética

Tal como se referiu anteriormente, a cistinúria é uma patologia de natureza genética, classicamente considerada como tendo um modo de transmissão autossómico recessivo, envolvendo pelo menos dois genes, *SLC3A1* e *SLC7A9*, cujos produtos proteicos constituem o sistema de transporte de aminoácidos heteromérico $b^{0,+}$ (figura 1.6). A cistinúria é causada por mutações em qualquer uma das duas subunidades do sistema de transporte apical $b^{0,+}$ de aminoácidos catiónicos [rBAT (*SLC3A1*) e $b^{0,+}$ AT (*SLC7A9*)] (Broer, 2008; Coe *et al*, 2005). Assim, e apesar de classicamente ter sido considerada uma doença monogénica, é na realidade uma patologia com hereditariedade (no mínimo) digénica (Calonge *et al*, 1995).

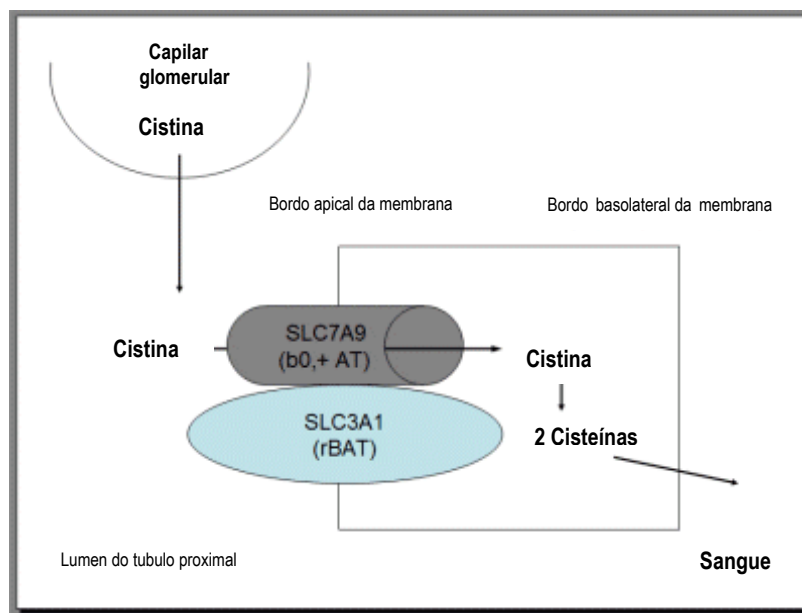


Figura 1.6 - Representação esquemática do transportador, exibindo as 2 subunidades codificadas por genes distintos. (Adaptado de: <http://images.google.pt/images?hl=ptPT&um=1&q=gene+SLC3A1&sa=N&start=72&ndsp=18>).

O gene *SLC3A1* (OMIM 104614) foi descrito pela primeira vez em 1994 (Yuen *et al*, 2006). Está localizado no cromossoma 2p21 (figura 1.7) e codifica a subunidade pesada glicoproteica rBAT do transportador heteromérico das células renais e epiteliais (Strologo *et al*, 2002; Francés *et al*, 2006). Este gene é composto por 10 exões e codifica um mRNA que dá origem a uma cadeia de 685 resíduos de aminoácidos. Estão descritas, na base de dados HGMD (*Human Gene Mutation Database*) até à data, 128 mutações neste gene em doentes com cistinúria (quadro 1.4), a maioria das quais são específicas de determinada população. A mutação p.M467T (c.1400T>C) é considerada a mais frequente (Scriver, 2008).

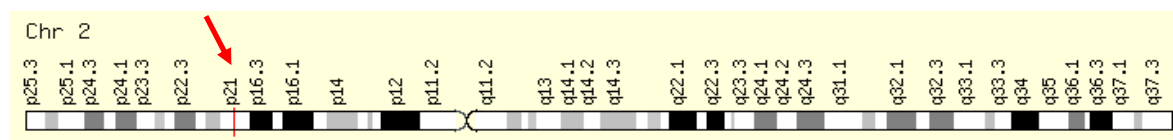


Figura 1.7 - Cromossoma dois e locus do gene *SLC3A1* (assinalado a vermelho). (Adaptado de <http://www.genecards.org/pics/loc/GC02P044414.SLC3A1.png>).

Quadro 1.4 - Mutações descritas no gene *SLC3A1* na base de dados *HGMD*.

Tipo de mutação	Número total de variações
<i>Missense/nonsense</i>	83
<i>Splicing</i>	9
Pequenas deleções	11
Pequenas inserções	5
Pequenas <i>indels</i>	2
Grandes deleções	16
Grandes inserções	1
Rearranjos complexos	1
TOTAL	128

(Adaptado de: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=SLC3A1>); (23-10-2009).

O segundo gene, *SLC7A9* (OMIM 604144) foi identificado em 1999 pelo Consórcio Internacional de Cistinúria (ICC). Localiza-se no cromossoma 19q13.1 (figura 1.8) e codifica a cadeia leve $b^{0,+}AT$. Este gene é composto por 13 exões e codifica um mRNA que dá origem a uma cadeia proteica de 487 resíduos de aminoácidos (Yuen *et al*, 2006).

As mutações neste gene causam cistinúria não-tipo I e estão descritas, até à data (Outubro de 2009), na base de dados *HGMD* 95 mutações (quadro 1.5). A mutação p.G105R (c.313G>A) é considerada a mais frequente neste gene (Schmidt *et al*, 2004).

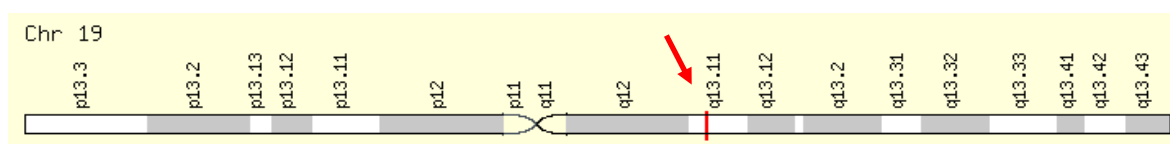


Figura 1.8 - Cromossoma 19 e *locus* do gene *SLC7A9* (assinalado a vermelho).
(Adaptado de: <http://www.genecards.org/pics/loc/GC19M038013.SLC7A9.png>).

Quadro 1.5 - Mutações descritas no gene *SLC7A9* na base de dados *HGMD*.

Tipo de mutação	Número total de variações
<i>Missense/nonsense</i>	51
<i>Splicing</i>	11
Pequenas deleções	22
Pequenas inserções	6
Grandes deleções	4
Grandes inserções	1
TOTAL	95

(Adaptado de: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=SLC7A9>); (23-10-2009).

A cistinúria é um fenótipo resultante de mutações num ou em ambos os genes. Mutações no gene *SLC3A1* conferem transmissão autossómica recessiva (cistinúria tipo I), enquanto que as mutações no gene *SLC7A9* conferem expressão autossómica dominante de penetrância incompleta (cistinúria não-tipo I). Ambos os genes se expressam no segmento S1-S2 e S3 nas células dos túbulos proximais e no intestino delgado, e são responsáveis pela reabsorção de cistina e aminoácidos básicos (Calonge *et al*, 1995).

Em 2002, Dello Strologo e colaboradores, realizaram um estudo em que concluíram que 14% dos portadores de mutações no gene *SLC7A9* tinham excreção de aminoácidos normal, pelo que sugeriram uma nova classificação dos doentes com cistinúria, baseada nos estudos genéticos:

- Tipo A: Cistinúria causada por mutações em ambos os alelos do gene *SLC3A1*. Neste tipo, os heterozigotos têm excreção normal de aminoácidos,
- Tipo B: Cistinúria causada por mutações em ambos os alelos do gene *SLC7A9*. Neste tipo, os heterozigotos normalmente (mas nem sempre) têm um incremento da excreção urinária de cistina e aminoácidos básicos, mas também podem ter um padrão normal (14% dos casos),
- Tipo AB: Cistinúria causada por uma mutação (ou mais) no gene *SLC3A1* e uma mutação (ou mais) no gene *SLC7A9*.

A prevalência de doentes AB é considerada baixa, contrariando as expectativas, tendo em consideração que a frequência de mutações no gene *SLC3A1* e *SLC7A9* é semelhante. Uma explicação possível reside no facto de estes doentes poderem ser portadores de um fenótipo ligeiro e escaparem ao diagnóstico, ou não serem correctamente rotulados no diagnóstico molecular por possuírem duas mutações num dos genes (que os caracteriza como sendo tipo A ou B), não sendo investigada a presença de mutações nos dois genes.

Devido ao facto de em muitos doentes cistinúricos não se observarem mutações nos genes descritos, no ano 2001, Daniel Leclerc, sugeriu a implicação de um terceiro gene causador de cistinúria. O gene *SLC7A10*, (homólogo ao *SLC7A9*) localizado na região 19q13.1, tem uma elevada expressão nos rins e codifica uma proteína com uma função semelhante à codificada pelo gene *SLC7A9*. Posteriormente conclui-se que o gene codifica um transportador de aminoácidos (asc-1) que exhibe selectividade para os aminoácidos neutros, incluindo a cisteína, mas não está envolvido na cistinúria. Além disso as alterações encontradas, que o associavam à cistinúria, não afectam a sua capacidade de transporte (Chairoungdua *et al*, 2001)

Como diversos casos de cistinúria permaneciam por explicar, em 2006 Chatzikyniakidou e colaboradores, tentaram mediante haplotipagem esclarecer melhor a complexidade genética associada a esta patologia (Chatzikyriakidou *et al*, 2006).

Para além das situações de cistinúria isolada estão também descritos na bibliografia fenótipos que associam a cistinúria com doença mitocondrial e hipotonia (Síndrome hipotonia-cistinúria), os quais estão relacionados com deleções em homozigotia nos genes contíguos em 2p21: *C2orf34*, *PPM1B*, *PREPL* (oligopetidase) e *SLC3A1*. Os indivíduos afectados apresentam um quadro de convulsões neonatais, hipotonia, atraso psico-motor, dismorfia facial e acidose láctica ocasional, secundária à alteração da oxidação dos ácidos gordos a nível mitocondrial. Há diferenças no tipo de fenótipo consoante os genes ausentes (Iraola e Langman, 2006; Jaeken *et al*, 2006; Parvari *et al*, 2005; Chabrol *et al*, 2008; Finer *et al*, 2006).

1.7.8. Objectivos

Dado o estado actual do conhecimento, referido na introdução, e dado que existem mais de duas dezenas de doentes com diagnóstico de cistinúria em Portugal, os objectivos do presente trabalho são:

1. Fazer um levantamento das famílias portuguesas com cistinúria.
2. Estudar as bases moleculares da cistinúria na nossa população.

3. Estabelecer um diagnóstico definitivo nos casos de cistinúria em estudo.
4. Identificar quais as mutações com transmissão dominante e quais as de transmissão recessiva.
5. Estabelecer uma relação entre excreção de cistina e aminoácidos básicos com determinados genótipos.
6. Identificação de genótipos de risco de nefrolitíase.
7. Fornecer ao clínico dados analíticos relevantes para um aconselhamento genético e terapia apropriada dos portadores com risco de desenvolvimento de sintomatologia.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Doentes e amostras

Foram seleccionadas para este estudo 12 famílias com pelo menos um elemento com diagnóstico de cistinúria. Nestes doentes o diagnóstico foi previamente estabelecido com base nos sinais clínicos (nomeadamente litíase precoce), análise do sedimento urinário e no perfil de aminoácidos urinários.

No quadro 2.1, encontram-se resumidas as principais características dos doentes em estudo, oito eram do sexo masculino e quatro eram do sexo feminino. A idade de diagnóstico variou entre os primeiros meses de vida e os 30 anos de idade.

Três doentes tiveram os primeiros sintomas no primeiro ano de vida (D1/FD, D1/FE, D1/FF), tendo o diagnóstico sido feito rapidamente em todos eles. Cinco desenvolveram litíase D1/FC, D1/FD, D1/FF, D1/FI e D1/FK.

Pelo menos quatro dos doentes são assintomáticos e foram diagnosticados no decurso da investigação metabólica para atraso, autismo ou hipotonia neonatal (D1/FB, D1/FG, D1/FH e D1/FL).

Na sequência da consulta médica foi feita, sempre que possível, colheita de urina de 24h ou de uma micção isolada para avaliação do estado presente do doente e, nalguns casos, para confirmação do diagnóstico bioquímico. Além disso, foi feita colheita de sangue para extracção de DNA para posterior estudo genético. Na sequência da investigação houve necessidade de efectuar colheita de sangue a alguns indivíduos para extracção de RNA.

Na maioria dos casos, estudaram-se também os familiares directos a nível bioquímico (análise quantitativa dos aminoácidos urinários) e a nível molecular (pesquisa das mutações detectadas nos casos índice e haplotipagem).

Foi obtido consentimento informado de todos os indivíduos incluídos no estudo.

Quadro 2.1 - Resumo da informação clínica disponível relativa aos casos índice estudados.

DOENTE				IDADE			CLÍNICA			TRATAMENTO		NOTAS
Caso	Sexo	CS	Familiares c/ litíase	Primeiros sintomas	I.D.	Actual	ITU Repetição	Cólicas renais	Litíase	Farmacológico	Cirurgico	
D1/FA	M	ND	ND	ND	ND	23A	ND	ND	ND	ND	ND	
D1/FB	M	N	N	AS	8M	10A	N	N	N	Água Citrato de sódio	N	Atraso cognitivo
D1/FC	F	N	3 irmãos	14A	30A	53A	N	S	BL	Água Litotricia	Nefrostomia (3x) rim esquerdo	Intolerância à Penicilamina e a Uralyt
D1/FD	M	N	Irmão e Pai	7M	13M	11A	N	S	BL	Água Tiopronina	Nefrostomia rim esquerdo	
D1/FE	F	N	Pai	12M	12M	8A	S	N	N	Água Uralyt	N	Dificuldades escolares; H e DA
D1/FF	M	N	Irmã	7M	7M	26A	N	S	BL	Água Uralyt Litotricia	Nefrostomia rim esquerdo	
D1/FG	M	Primos em 2º grau	N	AS	12M	3A8M	N	N	N	Água	N	46,XY,del(6)(q16.2q16.3)
D1/FH	M	N	N	AS	RN?	7A	N	N	N	Água Uralyt	N	Diagnóstico feito por investigação de hipotonia no período neonatal
D1/FI	M	N	Pai	20A	9A	22A	N	S	BL	Água Uralyt	N	
D1/FJ	F	ND	ND	ND	ND	8A	ND	ND	ND	ND	ND	
D1/FK	F	N	Irmão e Pai	5A	20A	50A	N	S	BL	Água Uralyt Litotricia	Nefrectomia direita (atrofia); Nefrostomia rim esquerdo	
D1/FL	M	N	N	AS	7A	9A4M	N	N	ND	Água	N	Espectro autista

Legenda: D1 - caso índice; F- família; CS - consanguinidade; I.D. - idade de diagnóstico; AS - assintomático; ITU- infecções do tracto urinário; N - não; S - sim; BL- bi-lateral; ND - não disponível; A - anos; M - meses; del - deleção; H - hiperactividade; DA - défice de atenção.

2.2. Análise dos aminoácidos

Os perfis de aminoácidos, obtidos a partir dos fluídos biológicos, podem funcionar como indicadores sensíveis de uma variedade de condições fisiológicas e patológicas entre as quais estão diversas doenças hereditárias do metabolismo.

Alterações na concentração de um ou vários aminoácidos na urina ocorrem quando os aminoácidos estão presentes em grande quantidade no filtrado glomerular, o que sucede em situações de doença metabólica e em defeitos do mecanismo de reabsorção tubular renal, tal como a cistinúria.

Devido ao facto de a depuração renal da cistina ser eficiente, os níveis séricos deste aminoácido permanecem normais, razão pela qual foi processada urina de cada um dos indivíduos estudados (e não o soro ou plasma) para a realização da análise dos aminoácidos. O método utilizado foi a cromatografia líquida de troca iónica por ser o mais utilizado e considerado o mais adequado, tendo a análise sido efectuada num analisador *Biochrom 30* (figura 2.1).

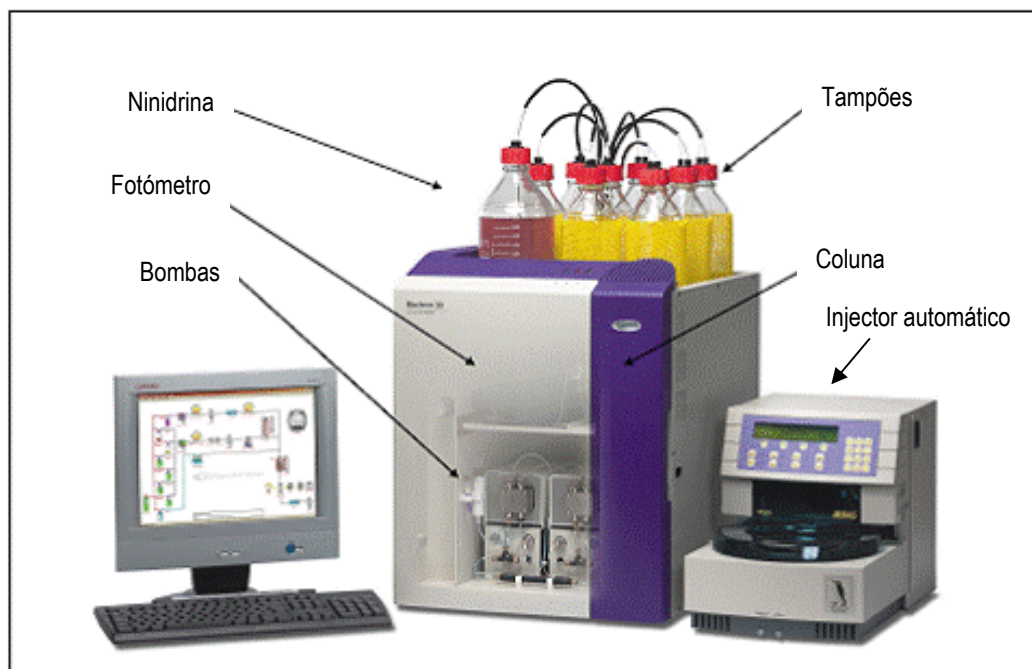


Figura 2.1 - Esquema representativo de um cromatógrafo para análise de aminoácidos.

2.2.1. Preparação da amostra

Na preparação das amostras de fluídos fisiológicos para a determinação dos aminoácidos livres, a desproteínização é uma etapa importante. A precipitação das proteínas é fundamental para evitar a fixação de aminoácidos como a cistina e a homocisteína às proteínas em solução, razão pela qual, deve ser realizada o mais rapidamente possível.

Além disso, dadas as suas características físico-químicas, as proteínas têm afinidade para a resina do analisador, pelo que a sua presença interfere com a qualidade analítica do sistema e com os resultados obtidos.

A amostra de urina utilizada é preferencialmente a primeira da manhã por ser a mais concentrada. A urina de 24h é importante na confirmação de resultados por apresentar valores mais reprodutíveis. A urina deverá ser rejeitada se estiver degradada, contaminada com fezes ou não identificada.

Na desproteínização utiliza-se habitualmente um tubo de centrífuga de fundo cónico. Adicionam-se cerca de 10-15 mg de ácido sulfossalicílico a 1 ml de urina e agita-se no vórtex. Coloca-se o tubo a 4°C durante pelo menos durante 10 minutos. Centrifuga-se 10 minutos a 3000 rpm e retira-se o sobrenadante que é depois filtrado num filtro de 0,2µm de porosidade.

O filtrado é mantido a 4°C (se a análise é efectuada num período de 48h), podendo ser conservado vários dias a -20°C.

2.2.2. - Cromatografia dos aminoácidos

Fundamento

A quantificação de aminoácidos é feita por comparação com uma mistura padrão de concentração conhecida (habitualmente 250 µM para a cistina e 500 µM para os restantes aminoácidos) processada nas mesmas condições.

À amostra são também adicionados um ou dois padrões internos (norleucina / S-2-aminoetil-L-cisteína) para monitorizar a resposta do sistema analítico e validar a corrida. Imediatamente antes da análise, é preparado um *vial* com amostra (60 µl) e padrão interno (30µl de norleucina 1 mM; *Sigma* P6323) o qual é colocado no prato do injectador automático sendo depois injectados 30µl, dos 90µl da mistura, no analisador de aminoácidos. A amostra passa por uma pré-coluna, sendo seguidamente arrastada pelo tampão para uma coluna analítica com resina de troca catiónica³. Dependendo das suas

³ A resina usada actualmente nos analisadores de aminoácidos consiste em esferas de polistireno. Os parâmetros variáveis na resina são a dimensão das esferas, o grau de sulfonação e o grau de cruzamento das cadeias.

características físico-químicas, os aminoácidos (que a pH 2.2 têm carga positiva) têm diferente afinidade para a coluna. A sua eluição é feita fazendo passar sucessivamente diversos tampões de lítio, com pH mais elevado e diferente força iónica sendo depois posicionados por um aumento de temperatura da coluna analítica durante a corrida. Estas alterações fazem com que o ponto isoiónico⁴ dos aminoácidos seja atingido, sendo este o ponto em que a atracção iónica com a resina é diminuta e o aminoácido é eluído da coluna. As condições do analisador de aminoácidos são programadas de modo que o ponto isoiónico de todos os aminoácidos seja atingido a tempos diferentes, concretizando-se assim a separação (anexo 4 - quadro A4). Seguidamente, o eluído da coluna é misturado com o reagente de ninidrina (colorimérico) e esta mistura atravessa então a bobine de reacção, que se encontra a uma temperatura elevada (135°C), permitindo a reacção entre os aminoácidos e a ninidrina.

A ninidrina é um agente oxidante que reage com o grupo amina dos aminoácidos libertando amónia, CO₂, um aldeído e uma forma reduzida de ninidrina: a hidrindantina. Esta reage depois com a amónia e com outra molécula de ninidrina originando uma substância arroxeadada (*Ruhemanns Purple*) com o máximo de absorvância de 570 nm. Na reacção com os iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) o produto final é um composto amarelo que é monitorizado a 440 nm. A intensidade de cor do complexo aminoácido-ninidrina é então medida nos dois comprimentos de onda referidos e efectuado o registo gráfico. No final da corrida cromatográfica obtém-se um cromatograma que constitui o perfil de aminoácidos da amostra analisada. Os aminoácidos então identificados com base no tempo de retenção e as suas concentrações calculadas informaticamente recorrendo a um *software* adequado (*EZChrom Elite*).

A concentração da cistina na urina é calculada com base na fórmula:

$$\text{Conc}_{(\mu\text{mol}/\text{mmolcreat})} = (\text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{padrão}}) \times 250 : \text{creatinina}_{(\text{mmol/L})}$$

Se utilizarmos urina de 24 horas o parâmetro creatinina é substituído pelo volume de urina (L) em 24 horas, pelo que a fórmula adquire a seguinte apresentação:

$$\text{Conc}_{(\mu\text{mol/l})} = (\text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{padrão}}) \times 250 \times V_{24\text{h}}(\text{L})$$

As concentrações de aminoácidos determinadas são depois comparadas com os valores de referência, em função do grupo etário (quadros 2.2 e 2.3).

⁴ O ponto isoiónico é definido como o pH em que todas as moléculas de um soluto, em solução, não apresentam carga.

O tempo de retenção de cada composto permite identificar o aminoácido, enquanto a área de cada pico cromatográfico é proporcional à quantidade de aminoácido presente.

Quadro 2.2 - Valores de referência dos aminoácidos com interesse para o diagnóstico de cistinúria expressos em $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina.

Aminoácidos	<1 M	1-6 M	6M-1A	1-2A	2-4A	4-7A	7-10A	10-13A	>13A
Cistina	24-78	13-48	12-29	10-26	8-30	8-22	8-21	7-23	6-34
Ornitina	0-19	0-13	0-8	0-8	0-7	0-7	0-6	0-6	0-5
Lisina	22-171	15-199	13-79	16-69	10-46	10-68	10-44	10-56	7-58
Arginina	0-14	0-11	0-11	0-8	0-9	0-7	0-6	0-6	0-5

(Adaptado do: SISLAB - sistema integrado de *software* laboratorial).

Quadro 2.3 - Valores de referência dos aminoácidos com interesse para o diagnóstico de cistinúria expressos em $\mu\text{mol}/24$ horas.

Aminoácidos	< 2 A	>2 A
Cistina	41-258	41-258
Ornitina	49-151	49-151
Lisina	10-140	48-640
Arginina	22-88	22-88

(Adaptado do: SISLAB - sistema integrado de *software* laboratorial).

A programação está feita de modo que após cada análise, a resina é submetida a um processo de lavagem com uma base forte, seguindo-se a reposição das condições de análise através da passagem de um tampão que equilibra o sistema analítico para a análise seguinte.

2.3. Extracção de ácidos nucleicos

Antes de iniciar o estudo genético é necessário proceder à extracção dos ácidos nucleicos e ao seu acondicionamento para obter material adequado à caracterização molecular. A extracção de DNA e de RNA são efectuadas por protocolos distintos. O RNA mensageiro é menos abundante e mais susceptível a degradação do que o DNA pelo que

o procedimento de extracção é mais complexo e exige cuidados adicionais na manipulação e conservação.

2.3.1. Extracção de DNA genómico

O DNA genómico total foi extraído, quer de sangue heparinizado, quer de sangue seco impregnado em cartão de *Guthrie*, consoante a amostra disponível.

Para a extracção utilizou-se o equipamento *BioRobot EZ1 (Qiagen)* e os *Kits Ez1 DNA Blood 350µl (Qiagen, Refª 951054)* e *Ez1DNA Tissue (Qiagen, Refª 953034)*, tendo-se procedido de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. O método utilizado baseia-se na tecnologia de partículas magnéticas e permite obter um DNA de elevada qualidade. Resumidamente, após lise celular, na presença de um sal caotrópico (desnaturante), o DNA liga-se à superfície de sílica das partículas magnéticas, as quais são seguidamente separadas do lisado mediante atracção de um íman. É então efectuada a lavagem para remoção de resíduos contaminantes sendo o DNA eluído com um tampão adequado.

O DNA assim obtido foi posteriormente quantificado no espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000*. Este equipamento permite também determinar o grau de pureza com base na razão Abs_{260}/Abs_{280} a qual deverá estar compreendida entre 1,5 e 2,0. Este parâmetro é utilizado como controlo de qualidade da extracção efectuada.

Posteriormente as amostras de DNA foram guardadas a -20°C até serem utilizadas.

2.3.2. Extracção de RNA

O sangue para extracção de RNA mensageiro foi colhido e armazenado em tubos *PAXgeneTM (Qiagen)* nas condições recomendadas pelo fabricante.

No isolamento do RNA utilizaram-se duas metodologias distintas. i) extracção automática no aparelho *QIAcube (Qiagen, Ref 9001292)* e, (ii), extracção manual utilizando o *Kit PAXgene Blood RNA (Qiagen)* aplicando o protocolo fornecido pelo fabricante. Este procedimento inicia-se com uma centrifugação durante a qual há precipitação e deposição dos ácidos nucleicos no fundo do tubo *PAXgene Blood RNA*. O *pellet* obtido é depois submetido a lavagens e ressuspenso em tampão adequado que contém *proteinase K* para que ocorra a digestão proteica. Uma segunda centrifugação é efectuada para remover os resíduos celulares sendo o sobrenadante transferido para novo tubo. Em seguida adiciona-se etanol e transfere-se o lisado para uma coluna de *PAXgene RNA*. Durante uma breve centrifugação, o RNA liga-se selectivamente à

membrana de sílica-gel da coluna e a maioria dos contaminantes são eliminados. Os restantes contaminantes são removidos em três passos de lavagem, sendo depois o RNA eluído em tampão. O RNA assim extraído deve ser de imediato colocado em gelo e armazenado a - 20°C, se for utilizado num curto espaço de tempo, ou a -70°C por períodos longos.

A integridade do RNA foi verificada por electroforese em gel de agarose 0,8% diluída em tampão TAE 1X com brometo de etídeo (*Merck* 1.11608), a 125Volts, 400mA, durante 15 minutos e a sua concentração e pureza medidas espectrofotometricamente no equipamento *Nanodrop* ND-1000 com base na razão Abs_{260}/Abs_{280} a qual deverá estar compreendida entre 1,8 e 2,0.

2.4. PCR - Polymerase Chain Reaction

2.4.1. Amplificação selectiva dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*

A amplificação da região codificante dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9* foi efectuada recorrendo à técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Os *primers* foram escolhidos de modo a emparelhar com as zonas intrónicas dos respectivos genes e foram desenhados recorrendo ao programa *Primer3* versão 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Foi adicionada a todos os *primers* uma cauda de 18pb o que permite utilizar um *primer* M13 universal para todos os exões no PCR de sequenciação, o que facilita a sua realização.

Nos quadros 2.4 e 2.5 estão referidas as sequências dos oligonucleótidos, a sequência das caudas (fragmentos a azul) e a informação relativa ao tamanho dos fragmentos obtidos na amplificação.

Quadro 2.4 - Primers específicos para amplificação das regiões codificantes do gene *SLC3A1*.

Exões	Designação	Caudas/Sequência	Nº de pb
1	<i>SLC3A1</i> – Ex 1/1/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT CAAGACCAAGCATT CAGCAA-3'	382
	<i>SLC3A1</i> – Ex 1/1/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC GATGAAGCACAGAAGCAG-3'	
	<i>SLC3A1</i> – Ex 1/2/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT CAGACAACCTGAAGCACAAAC-3'	398
	<i>SLC3A1</i> – Ex 1/2/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC CCAGGCATAATTTGGTTCTGA-3'	
2	<i>SLC3A1</i> – Ex 2/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT TTGTCCTTTAACTAAAACAAAGTGGG-3'	295
	<i>SLC3A1</i> – Ex 2/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC TGAAAAAGTGCTTCTCTCAAACC-3'	
3	<i>SLC3A1</i> – Ex 3/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT TTATTCTAATACAATCTTTCCTAGCA-3'	250
	<i>SLC3A1</i> – Ex 3/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC ATCTGCCTTTTACCCCTTG-3'	
4	<i>SLC3A1</i> – Ex 4/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT TCAGGGAGGGCAATGATCT-3'	300
	<i>SLC3A1</i> – Ex 4/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC TTGATTTTGCCTACACAATTACTG-3'	
5	<i>SLC3A1</i> – Ex 5/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT TGCCAAGTTGTTAACAGTCAAA-3'	284
	<i>SLC3A1</i> – Ex 5/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC TCAGGCTGAGAAAGAAAACACTC-3'	
6	<i>SLC3A1</i> – Ex 6/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT TGGGCATGCAATGTATGAAA-3'	242
	<i>SLC3A1</i> – Ex 6/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC TGAGGGATACACTGCAGATCA-3'	
7	<i>SLC3A1</i> – Ex 7/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT GCCTTCCCAGTCTTCTGACA-3'	298
	<i>SLC3A1</i> – Ex 7/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC AAGGCAACAGCAGCACATTA-3'	
8	<i>SLC3A1</i> – Ex 8/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT TGCTACGTTGTGAACTTTCTGTG-3'	370
	<i>SLC3A1</i> – Ex 8/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC CATGATTTT CAGCAATGCAA-3'	
9	<i>SLC3A1</i> – Ex 9/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT TCAGGACCAAAGCACATTTCT-3'	245
	<i>SLC3A1</i> – Ex 9/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC TTT CAGTAGAAACCCATTTCTTTGT-3'	
10	<i>SLC3A1</i> – Ex 10/1/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT TGGCAATTATAAGGGGCAAA-3'	398
	<i>SLC3A1</i> – Ex 10/1/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC CTTTGT CGGCAGAATTGGTA-3'	
	<i>SLC3A1</i> – Ex 10/2/F	5'-TGTA AACGACGGCCAGT ACATAATATGATTT CGGGCCTT-3'	328
	<i>SLC3A1</i> – Ex 10/2/B	5'-CAGGAAACAGCTATGACC GTTCACCAAGCAGCATGCTG-3'	

Nota: O estudo dos exões 1 e 10 implicou o seu desdobramento em dois fragmentos de menor dimensão.
 Legenda: Ex – exão, F - *primer forward*, B - *primer back*.

Quadro 2.5 - Primers específicos para amplificação das regiões codificantes do gene *SLC7A9*.

Exão	Designação	Caudas/Sequência	Nº de pb
2	<i>SLC7A9</i> – Ex 2/F <i>SLC7A9</i> – Ex 2/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT GCTGCTGCTGAACCAAGATT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC CTCGTT CAGACGCCCTTG-3'	214
3	<i>SLC7A9</i> – Ex 3/F <i>SLC7A9</i> – Ex 3/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT CCTGGGACATGGGCTTTG-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC TGCCATACATGTGCCAAGAG-3'	379
4	<i>SLC7A9</i> – Ex 4/F <i>SLC7A9</i> – Ex 4/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT GGGGCAGTGCCTCACAAG-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC CCTCTGTGCCAGGTCTTTTC-3'	342
5	<i>SLC7A9</i> – Ex 5/F <i>SLC7A9</i> – Ex 5/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT GGGCTTTGCTGAAAACCATA-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC GCTGCTCCTGCTCCCAGT-3'	243
6	<i>SLC7A9</i> – Ex 6/F <i>SLC7A9</i> – Ex 6/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT TTCCCGTGGAGATACACTCA-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC TGTTTTCCATGACAGGTGGA-3'	249
7	<i>SLC7A9</i> – Ex 7/F <i>SLC7A9</i> – Ex 7/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT GAGAATCTTAAATGAGGCCAACA-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC TCATGGAATACCCAGGGAAA-3'	235
8	<i>SLC7A9</i> – Ex 8/F <i>SLC7A9</i> – Ex 8/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT AGGGAGGGCGTCCATCTT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC CCTTACCCTTCCCACAAG-3'	250
9	<i>SLC7A9</i> – Ex 9/F <i>SLC7A9</i> – Ex 9/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT CTGGGAGGCCAGAATAGCTT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC GTCTTCCTCGGGGGTGATA-3'	259
10	<i>SLC7A9</i> – Ex 10/F <i>SLC7A9</i> – Ex 10/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT AGTGGCCCTGGACAGATG-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC CATCTGGGTCATTTGGAAGC-3'	250
11	<i>SLC7A9</i> – Ex 11/F <i>SLC7A9</i> – Ex 11/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT GGTCTTCTGTGACATGAGAACAGT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC TGCCCCTAGCATTGAAAGA-3'	297
12	<i>SLC7A9</i> – Ex 12/F <i>SLC7A9</i> – Ex 12/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT GAGGAGGGGGTACATGGAGT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC GGAGTCAGGACAGGTGAGGA-3'	356
13	<i>SLC7A9</i> – Ex 13/F <i>SLC7A9</i> – Ex 13/B	5'-TGTA AACGACGGCCAGT CCCACAACA ACTCCAGTGAA-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACC CCCTTCTAGAACCCCACT-3'	297

Legenda: Ex – exão, F - primer forward, B - primer back.

Foram efectuadas reacções de PCR com um volume final de 25 µl para amplificação dos 10 exões do gene *SLC3A1* e dos 12 exões do gene *SLC7A9* e das respectivas regiões flanqueadoras. Os reagentes e quantidades utilizadas são referidos no quadro 2.6. No quadro 2.7 estão indicadas as condições utilizadas na programação do termociclador para amplificação dos fragmentos. A temperatura de *annealing* (60°C) foi igual para todas as reacções.

Quadro 2.6 - Condições reaccionais para amplificação dos exões dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

Supermix* com Taq Platinum	Primer F (50pmol/µl)	Primer B (50pmol/µl)	DNA	Volume final
21,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	2,0 µl	25,0 µl

* Supermix (Invitrogen®) inclui tampão reaccional, Taq DNA polimerase hot-start, dNTPs e MgCl₂.

Quadro 2.7 - Condições de programação do termociclador utilizadas na amplificação das zonas codificantes dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

Temperatura (°C)	95	95	60	72	72	10
Tempo (minutos)	10	1	1	1	5	∞
		35 ciclos				

2.4.2. Controlo de qualidade interno

Foram sempre processados em paralelo com as amostras em estudo um controlo normal (sem mutações nos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*) e um branco de reagente ou controlo de amplificação negativa (com adição de água em vez de DNA), para excluir contaminações de reagente.

Por conseguinte, o trabalho experimental desenvolvido foi realizado utilizando controlos em cada ensaio individual em concordância com as recomendações gerais da “The European Molecular Genetics Quality NetWork-EMQN”.

2.4.3. Critérios de aceitação do PCR de amplificação

- i) ausência de amplificação para o branco de reagente.
- ii) amplificação de um fragmento com o tamanho pretendido para as amostras.
- iii) inexistência de bandas inespecíficas visíveis.

2.4.4. Análise e purificação dos produtos de PCR amplificados

Os resultados das reacções de amplificação foram verificados através de electroforese em gel de agarose a 2% (*Invitrogen* -155510-027) em tampão TAE 1X com brometo de etídeo (*Merck* -1.11608), a 125Volts, 400mA, durante 15 minutos. Nestas condições as moléculas do mesmo tamanho migram de modo idêntico e formam bandas que são visualizadas no transiluminador de luz ultra-violeta e/ou fotografia digital. Esta visualização resulta do facto de as moléculas de brometo de etídeo se intercalarem nas cadeias de DNA, que após exposição à radiação UV emitem fluorescência. Há uma relação de proporcionalidade inversa entre o espaço percorrido pelas moléculas de DNA e o seu tamanho, permitindo determinar o tamanho aproximado dos fragmentos por comparação da sua migração com um marcador que contém fragmentos que são múltiplos de 50 pb (*O' Gene Ruler*TM 50bp DNA Ladder ready-to-use - Fermentas).

Para visualizar e monitorizar a migração das moléculas de DNA utiliza-se o corante azul de bromofenol (ou 3,3,5,5-tetrabromofenolsulfonftaleína). A pH neutro, o corante absorve fundamentalmente luz vermelha e transmite luz azul.

Após a electroforese o gel foi fotografado e cada uma das bandas, correspondentes aos diversos amplificados, foi excisada com bisturi (*Swann-Morton*-0201), sob emissão de luz UV, e transferida para tubos *eppendorf* com filtro (*SpinX*, ; *Costar*, Ref.8163). Estes foram depois submetidos a uma centrifugação de 10.000 rpm/10 minutos, durante a qual há separação do DNA (que passa para o filtrado) da agarose que fica retida no filtro. O DNA fica assim purificado e está pronto a ser utilizado no PCR de sequenciação. O filtrado pode ser guardado a -20°C até utilização.

2.5. Sequenciação automática de fragmentos de DNA

2.5.1. Generalidades

Os métodos habitualmente utilizados para fazer a sequenciação resultam de adaptações do desenvolvido por Sanger *et al* em 1977, e que recorre a nucleótidos terminadores da cadeia que são didesoxinucleótidos trifosfatados marcados com um fluorocromo específico na extremidade 3'(ddNTP[F]), os quais permitem obter fragmentos marcados em 3' com diferentes dimensões. À medida que decorre a electroforese dos fragmentos estes são ordenados por tamanho e um laser detecta a fluorescência dos 4 didesoxinucleótidos, distinguindo os diferentes comprimentos de onda de luz emitida por radiação da amostra.

2.5.2. PCR assimétrico

O PCR de sequenciação utiliza apenas uma cadeia de DNA molde para sintetizar a cadeia complementar (PCR assimétrico). A utilização de um único *primer* implica que o produto se acumule linearmente e não exponencialmente como acontece na reacção de PCR de amplificação.

Cada um dos exões dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9* e respectivas sequências flanqueadoras intrónicas, foram submetidos a sequenciação automática após a realização de PCR assimétrico.

As amostras purificadas foram submetidas a PCR de sequenciação, utilizando a mistura comercial “*BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 2.0*” (*BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit – AB-Applied Biosystems - 4336776*) que possui dNTPs, ddNTPs marcados com 4 fluorocromos distintos, tampão e uma DNA polimerase. Os *primers* utilizados neste PCR assimétrico são os correspondentes às caudas M13 diluídos a 3.2pmol *forward* [F:5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'] e *reverse* [R:5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3']. A sua utilização simplifica o processo, pois são independentes do fragmento em estudo (*primers* universais), o que permite a uniformização das condições de amplificação.

As condições reaccionais e o programa do termociclador utilizados no PCR de sequenciação estão indicados nos quadros 2.8 e 2.9, respectivamente.

Quadro 2.8 - Condições reaccionais para a reacção do PCR de sequenciação de todos os fragmentos.

Produto de PCR	<i>Primer Forward ou Back M13 (3,2 pmol/μl)</i>	<i>Big Dye</i>	Volume final
2,5 μl	0,5 μl	2,0 μl	5,0 μl

Quadro 2.9 - Condições de programação do termociclador utilizadas na reacção do PCR de sequenciação.

Temperatura (°C)	94	94	50	60	4
Tempo	2'	10"	6"	4'	∞
	25 ciclos				

Legenda: (') = minutos; (") = segundos.

2.5.3. Purificação dos produtos amplificados no PCR assimétrico

A remoção dos ddNTPs, sais e oligonucleótidos excedentes é essencial à qualidade do electroforograma de sequenciação.

Para a purificação dos produtos de PCR de sequenciação utilizou-se o *Kit DyeEX 96* (Qiagen/63183), tendo-se procedido de acordo com as especificações do fabricante. Este *kit* possui placas de purificação que contêm uma resina em gel pré-hidratado. Esta resina, com propriedades cromatográficas, separa as moléculas pelo seu peso molecular. A resina fixa as impurezas e o excesso de nucleótidos livres permitindo obter um produto com as sequências de DNA sintetizadas em condições de ser sequenciado.

2.5.4. Desnaturação e análise mutacional

Ao produto purificado, foram adicionados 15 µl de formamida desionizada (*HI-DiTM* da *Applied Biosystems/4311320*), para ressuspender, diluir e desnaturar as cadeias de DNA ficando o mesmo pronto para ser submetido a sequenciação automática, a qual foi realizada num aparelho – *ABI PRISMTM 3130 XL Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*) de 16 capilares.

Todos os casos com alterações de sequência foram submetidos a novo PCR, processamento e análise para confirmação dos resultados obtidos, os quais foram registados num quadro resumo individual desenhado especificamente para o efeito e ao qual foram anexadas as sequências analisadas e o relatório final extraído do programa de análise automática de sequências (*SeqScape*).

A análise das sequências obtidas experimentalmente foi feita no programa *SeqScapeTM v.2.5.* da *Applied Biosystems* por comparação com as sequências de referência do gene *SLC3A1 (ENSG00000138079)* e *SLC7A9 (ENSG00000021488)*, disponíveis na base de dados *Ensemble Genome Browser* (<http://www.ensembl.org>).

As variações de sequência detectadas foram denominadas de acordo com as recomendações de nomenclatura de mutações da *Human Gene Variation Society* (*Den Dunnen & Antonarakis, 2001*).

2.6. Análise do mRNA

2.6.1. Síntese de cDNA

A primeira cadeia de DNA complementar ao mRNA (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total, recorrendo ao protocolo do *Kit SuperScriptTM III First-Strand Synthesis*

SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen™). Esta reacção é catalizada pela enzima retroviral transcriptase reversa (*Reverse Transcriptase*) que está incorporada na mistura do Kit.

Este protocolo foi otimizado para formar cDNA em dois passos. O procedimento é todo realizado em gelo e consiste na preparação de uma *master mix* com os seguintes componentes do Kit: 10 µl 2X RT *Reaction Mix* + 2 µl RT *Enzyme Mix*. Colocam-se 8 µl de cada amostra de RNA num tubo de 0.5 ml e simultaneamente processa-se um controlo negativo da síntese de cDNA, no qual se substitui o RNA por água bidestilada estéril. Adiciona-se 12 µl de *master mix* e homogeniza-se a solução que se centrifuga durante 1-2 segundos. Depois incubam-se as amostras no termociclador utilizando o seguinte programa:

- 25°C durante 10 minutos
- 50°C durante 30 minutos
- 85°C durante 5 minutos
- 4°C por tempo indeterminado

Após a incubação retiram-se os tubos e colocam-se em gelo. Adiciona-se 1 µl (2U) de coli *RNase H* (remoção de RNA) e incuba-se a 37° durante 20 minutos. Ao cDNA sintetizado adiciona-se 30 µl de *DEPC-treated water* e conserva-se a -20°C até utilização.

2.6.2. A amplificação do cDNA

O cDNA dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9* foi amplificado por PCR em 7 fragmentos utilizando *primers* desenhados especificamente para este estudo, recorrendo ao programa *Primer3*. A composição oligonucleotídica dos *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos está descrita nos quadros 2.10 e 2.11.

As condições de amplificação e o programa de termociclador utilizados foram iguais para todos os fragmentos e são os que constam dos quadros 2.12 e 2.7, respectivamente.

Quadro 2.10 - *Primers* específicos para amplificação do cDNA do gene *SLC3A1*.

Exão	Designação	Caudas/Sequência	Nº de pb
1	Fr 1	F - 5'- AGCATTTCAGCAAGCCACTCT -3' B - 5'- CAACTTCCCGAAATCTTCA -3'	661
2 - 3	Fr 2	F - 5'- GATGGGAACGGAGATCTGAA -3' B - 5'- GAACATCAGGATTGCGGAAA -3'	500
4 - 5	Fr 3	F - 5'- TTTCAATTGAGTCGGACACG -3' B - 5'- TGTATTGGTCCATGGTCTGC -3'	480
6 - 8	Fr 4	F - 5'- GCAAAGCACCTGAGAGATGA -3' B - 5'- GGAGTTCCAGGGAGTGTGAA -3'	540
9	Fr 5	F - 5'- TTGGTGGACCAGACAGTTCA -3' B - 5'- ATGCCATCCAGCTCTTTGT -3'	480
10 - 1	Fr 6	F - 5'- CCCAGATCGGCTTTGAAGT -3' B - 5'- TGGAATAGCATGCTCGATTG -3'	481
10 - 2	Fr 7	F - 5'- GACAAGGGAGAGGGACTCATC -3' B - 5'- TCAAAACATTTGAGAACCTTTCTT -3'	340

Nota: O estudo do exão 10 implicou o seu desdobramento em dois fragmentos de menor dimensão.

Legenda: FR- fragmento; F- *primer forward*; B - *primer back*; pb - pares de bases.

Quadro 2.11 - *Primers* específicos para amplificação do cDNA do gene *SLC7A9*.

Exão	Designação	Caudas/Sequência	Nº de pb
2	Fr 1	F - 5'- CATGGCCATTTCTAGGGTTG -3' B - 5'- GTTGCTGAGCACAGACTTGG -3'	421
3	Fr 2	F - 5'- AAGTCGATCCAGAGCCAAGA -3' B - 5'- TAGAAGGGCGCACACACATA -3'	424
4 - 5	Fr 3	F - 5'- ATCCCCGCCTACCTTTCT -3' B - 5'- TCCATCATAGGCCAGACTC -3'	486
6 - 8	Fr 4	F - 5'- GCCCAAGGAAACACAAAGAA -3' B - 5'- GCCACAAAAAGTGAACGAT -3'	362
9 - 10	Fr 5	F - 5'- GTGATGACTGCCACCGAAC -3' B - 5'- ATGCGGCAAAGCTGAAATAA -3'	363
11 - 12	Fr 6	F - 5'- CCGCCATCATCTTTTATGGT -3' B - 5'- GCATCTGAAGGTGCATGGTA -3'	484
13	Fr 7	F - 5'- CCACCTGGGAGTACCTCTACTG -3' B - 5'- GGAAGAAATAACCACAAATATTGC -3'	272

Legenda: FR- fragmento; F- *primer forward*; B - *primer back*; pb - pares de bases.

Quadro 2.12 - Condições reaccionais para amplificação do cDNA dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

<i>ImmoMix™ Red*</i>	<i>Primer F</i> (10pmol/μl)	<i>Primer B</i> (10pmol/μl)	DNA	H ₂ O	Volume final
12,5 μl	1,0 μl	1,0 μl	4,0 μl	6,5 μl	25,0 μl

**ImmoMix™ Red* (Bioline) inclui tampão reaccional, Taq DNA *polimerase hot-start*, dNTP e MgCl₂.

2.7. Rastreo populacional

Para cada uma das alterações encontradas e não descritas na base de dados profissional *on-line*: *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (https://portal.biobaseinternational.com/cgi-bin/portal/login.cgi?redirect_url=/hgmd/pro/start.php), foi efectuado um rastreo populacional em 100 amostras de DNA (200 alelos), de indivíduos da população portuguesa, escolhidos de forma aleatória, provenientes do Laboratório de Genómica Funcional do Centro de Histocompatibilidade do Centro.

O DNA de cada aliquota foi quantificado utilizando o espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* e todas as amostras e controlos foram diluídas à concentração de 20 ng/μl.

Os *primers* utilizados na análise das alterações estudadas encontram-se descritos no quadro 2.13 e foram desenhados especificamente para este estudo no programa *Primer3*.

A verificação de eventual formação de estruturas secundárias e ligação entre *primers* foi realizada recorrendo ao programa de bioinformática disponível *on-line* em: <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid/twostate-fold.phpados>.

Os estudos populacionais foram realizados pela técnica *High Resolution Melting Curve Analysis* (hrMCA) que utiliza o PCR *High Resolution Melt* (HRM) e o termociclador *Rotor-Gene™ 6000* (*Rcorbett*), respeitando as recomendações do fabricante.

A técnica hrMCA, foi descrita e desenvolvida em 2003 por *Wittwer* e colaboradores. Consiste na análise das curvas obtidas através da monitorização de *melting* de produtos de PCR na presença de um corante (*EverGreen™*) que se intercala no dsDNA (quando lhe é aplicado um gradiente de temperatura) e emite fluorescência. A temperatura de *melting* (*T_m*) e o perfil obtido depende do conteúdo em GC, dimensão e sequência do produto de PCR. Através da comparação das diferenças do perfil da curva de *melting* entre dois ou mais produtos, e utilizando *software* específico, é possível detectar alterações até um par de bases ao nível da sequência do DNA. Este método

pode ser utilizado em diferentes aplicações tais como genotipagem e rastreio de mutações, apresentando uma elevada sensibilidade e especificidade associados a um baixo custo e facilidade de execução.

Quadro 2.13 - *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos analisados nos estudos populacionais por PCR-HRM.

Gene	Alteração	Sequência de <i>primers</i>	Nº pb
SLC3A1	c.231T>A (p.S77S)	F -5'- CCGAAGACATAAGTCGGTGAG-3' B -5'-GCTGTGCTTCAGTTGTCTG-3'	164
	c.611-2A>C	F -5'-ATCAGGGAGGGCAATGATCT-3' B -5'-TTGCGAAATTTAAATCAGGTT-3'	178
	c.1136+44G>A	F -5'-GACCATGGACCAATACAGCA-3' B -5'-TCAATTAGAGTTATGCAGGCTTGT-3'	165
	c.1190A>G (p.Y397C)	F -5'-CCGATGACACTGAACCTTGT-3' B -5'-TCATACACGCTGTTCCCAGA-3'	173
	c.1593T>A (p.Y533N)	F -5'-TCAGGACCAAAGCACATTTCT-3' B -5'-TTTCAGTAGAAACCCATTTCTTTGT-3'	245
	c.*70A>G	F -5'-GCTTTGTTTCCAATCGAGCA-3' B -5'-GATTGTTACCAAGCAGCAT-3'	152
SLC7A9	c.216C>T (p.C72C)	F -5'-TCAGTGGCATCTCCATCATC-3' B -5'-AGGCTCCCAAGTCTCTTTACC-3'	158
	c.1119G>A (p.S373S)	F -5'-CGATTATATCATCCCTGGTGAC-3' B -5'-GGCTGCAAGCTTACCTTGAT-3'	151
	c.*82C>T	F -5'-AAGCTCCGTCTCTTGTAGCC-3' B -5'-CCCTTTCTAGAACCCCACT-3'	160

As condições reaccionais de amplificação para todos os fragmentos encontram-se discriminadas no quadro 2.14. Em simultâneo, com as amostras para estudo populacional, processaram-se dois controlos positivos para comparação das temperaturas de *melting*. O programa de termociclador utilizado para amplificação é o que consta do quadro 2.15.

Quadro 2.14 - Condições reaccionais para amplificação dos fragmentos de DNA utilizados nos estudos populacionais por PCR HRM.

Master Mix*	H ₂ O	Primer F (10pmol/µl)	Primer B (10pmol/µl)	DNA	Marcador EverGreen	Volume final
10,0 µl	4,2 µl	1,0 µl	1,0 µl	3,0 µl	0,8 µl	20,0 µl

*Master Mix (Promega) inclui tampão reaccional, Taq DNA polimerase hot-start, dNTP e MgCl₂.

Quadro 2.15 - Programa utilizado no termociclador para a amplificação dos fragmentos analisados nos estudos populacionais por PCR-HRM.

Temperatura (°C)	95	95	60	72	72	10
Tempo	5'	30"	30"	45"	5'	∞
	40 ciclos					

Legenda: (') = minutos; (") = segundos.

2.8. Estudo de haplotipagem por SNPs

Com o objectivo de validar o modo de transmissão da doença nalgumas famílias em que a identificação da mutação causal não era evidente, e estabelecer algumas correlações com o descrito na bibliografia, tentaram identificar-se genótipos de risco de nefrolitíase estabelecendo-se haplótipos, baseados nas alterações encontradas por sequenciação nos respectivos genes.

2.9. Análise bioinformática

Foram utilizados diversos recursos bioinformáticos no decurso deste trabalho.

O programa *Primer3* versão 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) foi utilizado para desenhar os *primers*.

A verificação de eventual formação de estruturas secundárias entre *primers* foi realizada recorrendo ao programa disponível em :

<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid/twostate-fold.phpados>.

A consulta das sequências de referência do gene *SLC3A1* (**ENSG00000138079**) e *SLC7A9* (**ENSG00000021488**), foi realizada nas bases de dados *Ensemble Genome Browser* e *NCBI*, respectivamente em: <http://www.ensembl.org> e http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6519?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVDocSum.

Para cada pesquisa e consulta de mutações descritas recorreu-se à base de dados profissional *on-line*: *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (https://portal.biobaseinternational.com/cgi-bin/portal/login.cgi?redirect_url=/hgmd/pro/start.php).

A pesquisa de SNPs foi efectuada na base de dados *Ensemble Genome Browser* em: <http://www.ensembl.org>.

A previsão das alterações de *splicing* foi efectuada no programa *Human Splicing Analyser v.2.3* (<http://www.umd.be/HSF/>) que calcula os scores para sequências dadoras e aceitadoras de *splicing* e o software *GenScan* (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>).

A comparação da homologia de sequências de aminoácidos não descritas, foi efectuada recorrendo ao programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o alinhamento das sequências seleccionadas foi realizado no programa *ClustalX* (www.ebi.ac.uk/clustalx).

A avaliação do impacto das mutações *missense* foi realizada no programa *Polyphen* e SIFT, respectivamente em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/> e <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>.

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

III- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo incidiu num grupo seleccionado de famílias em que existia pelo menos um caso com diagnóstico clínico/bioquímico de cistinúria (quadro 2.1). Para além dos doentes, sempre que possível, foram também estudados os progenitores, os irmãos, e em situações esporádicas, outros membros da família (avós e sobrinhos). No total foram investigados 35 indivíduos, 18 do sexo feminino e 17 do masculino, sendo 12 casos index e 23 familiares.

3.1. Análise de aminoácidos

A análise quantitativa dos aminoácidos na urina é crucial para o diagnóstico e posteriormente para a monitorização terapêutica dos doentes com cistinúria (figura 3.1).

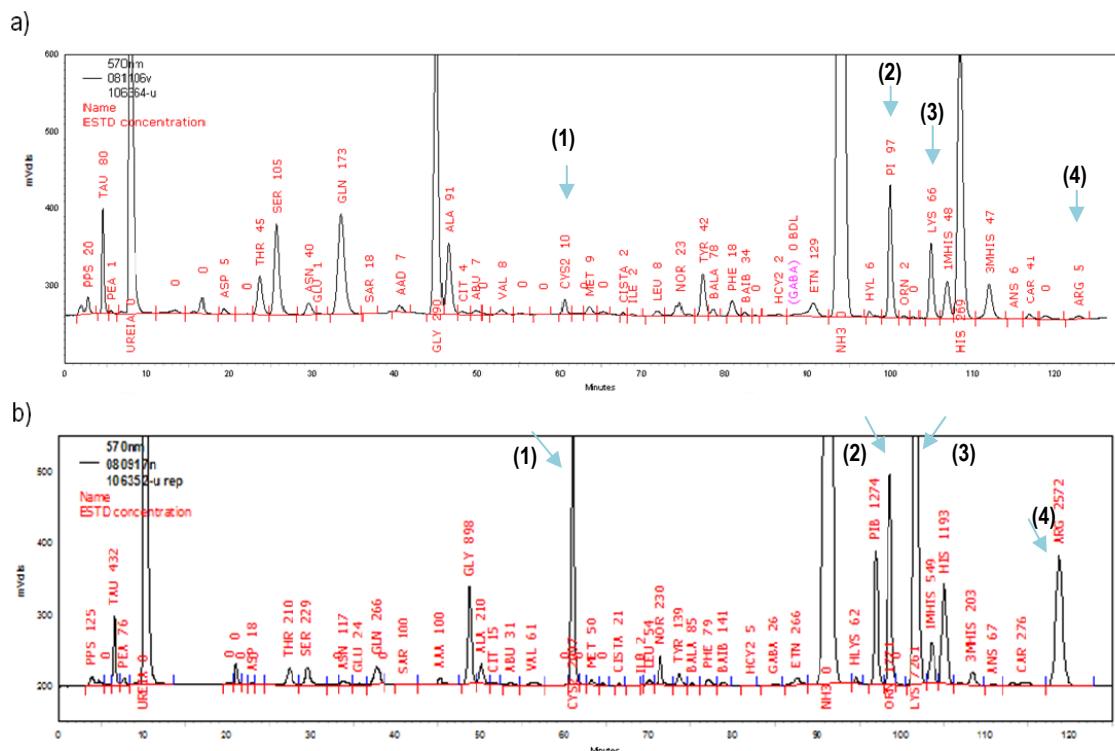


Figura 3.1 - Cromatograma dos aminoácidos urinários de a) um controlo normal e b) de um doente com cistinúria, exibindo uma excreção aumentada de cistina (1) e aminoácidos básicos (ornitina (2), lisina (3) e arginina (4)). As setas permitem comparar os picos cromatográficos nas duas situações.

No quadro 3.1 encontram-se os resultados da cromatografia de aminoácidos efectuada nos casos índice na sequência da consulta de genética prévia à realização dos estudos moleculares e no quadro 3.2 os resultados dos progenitores referentes ao mesmo período de tempo.

Adicionalmente foi feito um levantamento retrospectivo dos perfis de aminoácidos urinários de cada doente e seus familiares, tendo-se transferido dos boletins analíticos para uma folha de cálculo, os valores correspondentes à concentração de cistina, ornitina, lisina e arginina. Estes resultados foram agrupados por família e incluíram: as análises ao diagnóstico bem como os controlos analíticos posteriores (anexo 5 - quadro A5).

3.2. Classificação dos doentes com cistinúria

Na literatura estão referidas diversas formas de classificação dos doentes com cistinúria de acordo com o fenótipo apresentado.

a) Baseada na excreção de cistina pelos doentes

A classificação nos vários tipos de cistinúria faz-se tradicionalmente com base na excreção de aminoácidos na urina. Assim, orientando-nos pelos valores referidos na literatura para a concentração de cistina em grupos de indivíduos distintos: população normal, doentes homocigotos e heterocigotos para cistinúria (referidos previamente na secção 1.7.1) tentamos classificar o grupo dos doentes em estudo (quadro 3.3). Em dois dos casos (D1/FE e D1/FF) como não foi disponibilizada amostra de urina, na consulta médica prévia a este estudo, recorreremos ao valor de um doseamento prévio em urina de 24H como orientador (anexo 5).

Sete doentes (D1/FA, D1/FC, D1/FD, D1/FE, D1/FF, D1/FH, D1/FK) foram classificados como homocigotos para cistinúria e cinco (D1/FB, D1/FG, D1/FI, D1/FJ, D1/FL) como heterocigotos tipo não-I, (correspondendo às formas em que os portadores apresentam uma excreção de cistina aumentada embora inferior à dos homocigotos). Esta sectorização dos doentes permite-nos identificar, para além dos cistinúricos homocigotos, indivíduos que parecem ser portadores sintomáticos e que também excretam quantidades aumentadas de cistina (provavelmente heterocigotos tipo II).

Quadro 3.1 - Concentração de glicina, cistina, ornitina, lisina e arginina urinária dos doentes em estudo referente ao controlo analítico mais recente.

ID	[Glicina]	VR	Ratio Gly	[Cistina]	VR	Ratio Cys	[Ornitina]	Ratio Orn	VR	[Lisina]	Ratio Lys	VR	[Arginina]	VR	Ratio Arg
D1/FA	1609 µmol/24h	160-4201	0.7	1870 µmol/24h	40-258	12.4	3761 µmol/24h	37.6	49-151	10276 µmol/24h	29.9	48-640	6151 µmol/24h	22-88	111.8
D1/FB	115 µmol/mmol creat	64-165	1.0	62 µmol/mmol creat = 548 µmol/gr creat	7_23	4.1	12 µmol/mmol creat = 106 µmol/gr creat	4.0	0-6	232 µmol/mmol creat = 2053.1 µmol/gr creat	7.0	10_56	10 µmol/mmol creat = 88.5 µmol/gr creat	0-6	3.3
D1/FC	1711 µmol/24h	160-4200	0.8	3842 µmol/24h	40-258	25.6	2047 µmol/24h	20.4	49-151	17649 µmol/24h	51.3	48-640	4795 µmol/24h	22-88	87.2
D1/FD	1719 µmol/24h	160-4200	0.8	2184 µmol/24h	40-258	14.5	1984 µmol/24h	19.8	49-151	11444 µmol/24h	33.3	48-640	2277 µmol/24h	22-88	41.4
D1/FE	ND			ND			ND			ND			ND		
D1/FF	ND			ND			ND			ND			ND		
D1/FG	61 µmol/mmol creat	111-326	0.4	50 µmol/mmol creat = 442.5 µmol/gr creat	6_34	2.5	31 µmol/mmol creat = 274.3 µmol/gr creat	8.8	0-7	572 µmol/mmol creat = 5061.9 µmol/gr creat	20.4	10_46	19 µmol/mmol creat = 168 µmol/gr creat	0-9	4.2
D1/FH	224 µmol/mmol creat	84-236	1.4	325 µmol/mmol creat = 2876 µmol/gr creat	8_21	22.4	133 µmol/mmol creat = 1177 µmol/gr creat	44.3	0-6	1064 µmol/mmol creat = 9415.9 µmol/gr creat	39.4	10_44	85 µmol/mmol creat = 752 µmol/gr creat	0-6	28.3
D1/FI	476 µmol/24h	160-4200	0.2	1471 µmol/24h	40-258	9.8	612 µmol/24h	6.1	49-151	5512 µmol/24h	16.0	48-640	293 µmol/24h	22-88	5.3
D1/FJ	1539 µmol/24h	160-4200	0.7	1153 µmol/24h	40-258	6.4	1603 µmol/24h	16.0	49-151	2849 µmol/24h	8.3	48-640	3581 µmol/24h	22-88	65.1
D1/FK	2117 µmol/24h	160-4200	1.0	2821 µmol/24h	40-258	18.8	1962 µmol/24h	19.6	49-151	12330 µmol/24h	35.8	48-640	4406 µmol/24h	22-88	80.1
D1/FL	507 µmol/24h	160-4200	0.2	921 µmol/24h	40-258	6.1	379 µmol/24h	3.8	49-151	2750 µmol/24h	8.0	48-640	241 µmol/24h	22-88	4.4

Quadro 3.2 - Concentração de cistina, ornitina, lisina e arginina urinária detectada nos progenitores dos doentes em estudo.

ID	[Cistina]	VR	Ratio Cys	[Ornitina]	VR	Ratio Orn	[Lisina]	VR	Ratio Lys	[Arginina]	VR	Ratio Arg
P/FD	105 µmol/24h	41-258	0.7	41 µmol/24h	49-151	0.4	593 µmol/24h	48-640	1.7	63 µmol/24h	22-88	1.1
M/FD	51 µmol/24h	41-258	0.4	28 µmol/24h	49-151	0.3	321 µmol/24h	48-640	0.9	13 µmol/24h	22-88	0.2
P/FE	15 µmol/24h	41-258	0.1	4 µmol/24h	49-151	0.1	62 µmol/24h	48-640	0.2	8 µmol/24h	22-88	0.1
M/FE	107 µmol/24h	41-258	0.7	8 µmol/24h	49-151	0.1	280 µmol/24h	48-640	0.8	50 µmol/24h	22-88	0.9
M/FF	121 µmol/24h	41-258	0.8	19 µmol/24h	49-151	0.2	1064 µmol/24h	48-640	3.1	31 µmol/24h	22-88	0.6
P/FG	5 µmol/mmol creat	6_34	0.3	1 µmol/mmol creat	0-5	0.4	30 µmol/mmol creat	7_58	0.9	2 µmol/mmol creat	0-5	0.8
M/FG	12 µmol/mmol creat	6_34	0.6	3 µmol/mmol creat	0-5	1.2	72 µmol/mmol creat	7_58	2.2	4 µmol/mmol creat	0-5	1.6
P/FI	156 µmol/mmol creat	6_34	7.8	54 µmol/mmol creat	0-5	21.6	458 µmol/mmol creat	7_58	14.0	18 µmol/mmol creat	0-5	7.2
M/FI	274 µmol/24h	41-258	1.8	72 µmol/24h	49-151	0.7	885 µmol/24h	48-640	2.6	45 µmol/24h	22-88	0.8
M/FJ	23 µmol/24h	41-258	0.2	7 µmol/24h	49-151	0.1	61 µmol/24h	48-640	0.2	7 µmol/24h	22-88	0.1
P/FK	828 µmol/24h	41-258	5.5	372 µmol/24h	49-151	3.7	2042 µmol/24h	48-640	5.9	206 µmol/24h	22-88	3.7
M/FL	55 µmol/24h	41-258	0.3	15 µmol/24h	49-151	0.2	190 µmol/24h	48-640	0.5	15 µmol/24h	22-88	0.3

Nota: O *ratio* é calculado conforme se refere na página 54.

Quadro 3.3 - Classificação dos doentes em função do fenótipo bioquímico. (a) Classificação em função da excreção de cistina. (b) Classificação em função da excreção de cistina dos progenitores. (c) Classificação em função do ICC. (d) Classificação pelo *ratio para a cistina*.

Doentes	[cistina] urinária	(a) Classificação dos doentes em função do fenótipo bioquímico						(b) Classificação dos doentes em função da excreção de cistina pelos progenitores (portadores obrigatórios) (1*)				(c) Classificação dos doentes em função da orientação do Consórcio Internacional da Cistinúria (4*)		(d) Nova classificação em função do <i>ratio</i>	
		Excreção de cistina na urina													
		Homozigotia para a cistinúria			Heterozigotia não tipo I (tipo II e III)			Conclusão							
		> 400 mg/dia (2*) (> 1.7 mmol/dia)	> 1.000 μmol /g creat (3*)	> 113 μmol /mmol creat (3*)	200-400 mg/dia (1*) (0.8-1.7 mmol/dia)	990-1740 e 100-600 μmol /g creat (1*)		Tipo I	Tipo não-I	Tipo misto	Tipo Indefinido	Homozigoto	Heterozigoto não tipo I	<i>Ratio</i>	Conclusão
D1/FA	1870 μmol/24h	1,8 mmol/dia						X					12.4	Homozigoto	
D1/FB	62 μmol/mmol creat = 548 μmol/gr creat				548 μmol/gr creat	Heterozigoto não tipo I				X?	X?		4.1	Heterozigoto não tipo I	
D1/FC	3842 μmol/24h	3,8 mmol/dia				Homozigoto							25.6	Homozigoto	
D1/FD	2184 μmol/24h	2,1 mmol/dia				Homozigoto	X			X			14.5	Homozigoto	
D1/FE	(Δ)		4372 μmol/g creat (*)			Homozigoto	X			X			26.0	Homozigoto	
D1/FF	(Δ)		2469 μmol/g creat (*)			Homozigoto			X	X			18.6	Homozigoto	
D1/FG	50 μmol/mmol creat = 442.5 μmol/gr creat				442.5 μmol/gr creat	Heterozigoto não tipo I			X	X?	X?		2.5	Heterozigoto não tipo I	
D1/FH	325 μmol/mmol creat = 2876 μmol/gr creat		2876 μmol/g creat			Homozigoto				X			22.4	Homozigoto	
D1/FI	1471 μmol/24h			1,471 mmol/dia		Heterozigoto não tipo I			X				9.8	Heterozigoto não tipo I	
D1/FJ	1153 μmol/24h			1,1 mmol/dia		Heterozigoto não tipo I			X				7.7	Heterozigoto não tipo I	
D1/FK	2821 μmol/24h	2,8 mmol/dia				Homozigoto			X				18.8	Homozigoto	
D1/FL	921 μmol/24h			0,9 mmol/dia		Heterozigoto não tipo I			X				6.1	Heterozigoto não tipo I	

Legenda: Podemos considerar equivalentes as excreções por dia e por 24h. (Δ) Resultado retirado do anexo 5, uma vez que não disponibilizada amostra para urina durante o último ano.
d) Classificação em função do *ratio*: Heterozigoto tipo I ou normal - ver quadro 3.4 (dependente da idade); heterozigoto tipo não I – valor superior ao normal para a idade mas inferior a 11; homozigoto ≥ 11 .

Bibliografia: (1*) Chandra S. Biyani *et al*, 2006. (2*) Manuel Palacin *et al*, 2006. (3*) M. Guillén *et al*, 1999. (4*) International Cystinuria Consortium.

b) Com base na excreção de cistina pelos portadores obrigatórios (progenitores)

De acordo com a literatura os heterozigotos de cistinúria tipo I (também designados “silenciosos”) têm aminoacidúria normal (excreção de cistina <100 µmol cistina/g creatinina), enquanto os do tipo II e III têm excreção aumentada sendo considerada, respectivamente, *hiper-excreção* e *excreção moderada* de cistina e de aminoácidos básicos (990-1740 e 100-600 µmol cistina/g creatinina). Por vezes é difícil distingui-los entre si, e cerca de 14% destes portadores têm excreção normal de aminoácidos (Martens *et al*, 2008). Os heterozigotos tipo I e III normalmente não desenvolvem cálculos de cistina (Leclerc *et al*, 2001).

Com base nos critérios referidos em 1.7.1 da introdução e na excreção urinária de aminoácidos dos progenitores (quadro 3.2) ensaiamos uma outra classificação (quadro 3.3).

Esta classificação permite-nos clarificar a situação de dois dos doentes (D1/FD e D1/FE) homozigotos para cistinúria como *homozigotos tipo I* e um heterozigoto (D1/FI) considerado como *tipo misto* com base no estudo dos progenitores.

Este modelo classifica ainda como doentes de *tipo indefinido* quatro casos (D1/FF, D1/FJ, D1/FK e D1/FL), por só estar estudado bioquimicamente um dos progenitores.

c) Com base nos critérios do Consórcio Internacional para a Cistinúria

O Consórcio Internacional de Cistinúria (ICC) publicou em 2001 um trabalho onde refere as concentrações de aminoácidos encontradas em doentes com *cistinúria não-tipoI*, *heterozigotos obrigatórios para cistinúria não-tipoI* e controlos normais (anexo 6 - quadro A6).

Utilizando esta grelha de valores como orientadora, e recorrendo às concentrações de aminoácidos referidas nos quadros 3.1 (e ao anexo 5 quando necessário) procedemos a uma nova classificação dos doentes em estudo (quadro 3.3).

Há doentes como D1/FE, D1/FF e D1/FH que são facilmente classificados como homozigotos uma vez que apresentam excreção de todos os aminoácidos concordante com homozigotia.

Contudo, em alguns dos casos verificamos que não há um enquadramento perfeito com os valores fornecidos pelo ICC. Por exemplo no caso D1/FG a concentração de cistina urinária enquadra-se bem no intervalo de referência para heterozigotos (heterozigotos não tipo I: 87 – 1069) mas é suficientemente alta para que o doente possa

também ser considerado um homozigoto [cys] = 443 µmol/g creatinina (homozigotos: 445 - 3201).

Quando consideramos a excreção de aminoácidos básicos por este doente verificamos que a excreção de ornitina 274 µmol/g creatinina (homozigotos: 367 – 3231; heterozigotos não tipo I: 17 - 488) e arginina 168 µmol/g creatinina (homozigotos: 4774 - 22854; heterozigotos não tipo I: 17 - 488) está em concordância com uma heterozigotia. Pelo contrário a excreção de lisina 5062 µmol/g creatinina (homozigotos: 1952 – 11303; heterozigotos não tipo I: 1 - 360) é compatível com homozigotia.

Por fim a análise do somatório da excreção dos quatro aminoácidos envolvidos na cistinúria, e que pode ser utilizada para classificar os doentes resulta igualmente ambígua (Σ [Cys], [Orn], [Lys], [Arg] = 5946 µmol/g creatinina (homozigotos: 4774 - 22854; heterozigotos não tipo I: 440 - 6596).

No caso do doente D1/FB observa-se uma excreção de ornitina, arginina e do somatório dos quatro aminoácidos concordante com heterozigotia mas as concentrações de cistina e lisina são compatíveis quer com o homozigotia quer com a heterozigotia.

Nos restantes doentes não foi feita esta análise porque as unidades em que estão indicadas as concentrações de aminoácidos não nos permitem, sem dados adicionais, efectuar cálculos de conversão em µmol/g creatinina.

d) Com base no ratio [Cys doente] / média da [Cys] população de referência

Atendendo a que os diagnósticos de cistinúria foram sendo feitos ao longo de de muitos anos, os valores que constam do anexo 5 correspondem a um espaço temporal alargado, (± 20 anos). Durante este período as metodologias foram sendo modificadas, bem como os respectivos intervalos de referência. Para além do mais, os sistemas unitários utilizados também variam consoante o tipo de amostra (micção isolada/urina de 24 h). Por tudo acima referido foi feita uma tentativa de uniformização mediante o cálculo de um factor que traduzisse quantas vezes a excreção está aumentada (em relação à média da população normal para o grupo etário correspondente ficando independente do sistema unitário):

$$R = \frac{\text{Concentração de um aminoácido na urina}}{\text{Média da concentração do mesmo aminoácido na população normal}}$$

A determinação deste factor (R) permitiu-nos avaliar de modo aproximado a magnitude de excreção de cistina dos doentes face ao intervalo de referência.

Posteriormente este cálculo foi também efectuado para os outros aminoácidos cujo transporte se encontra alterado na cistinúria – os aminoácidos básicos, bem como para a glicina (exemplo demonstrativo de que a reabsorção dos restantes aminoácidos está conservada) (quadro 3.1). Efectivamente a cistinúria não cursa com uma hiperaminoacidúria generalizada, mas sim limitada aos aminoácidos transportados pelo sistema $b^{0,+}$ (rBAT/ $b^{0,+}$ AT).

Foram também calculados com o apoio do serviço de Informática, do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães, novos valores de referência para a cistina, ornitina, lisina e arginina na urina para os grupos etários utilizados habitualmente [0 - 1 mês; 1 - 6 meses; 6 - 12 meses, 1 - 2 anos, 2 - 4 anos, 4 - 7 anos, 10 - 13 anos e superior a 13 anos]. Para o efeito foram processadas as concentrações obtidas na cromatografia de aminoácidos urinários (de 100 indivíduos por grupo etário) em que o perfil cromatográfico não revelou alterações. Com estes valores de referência e respectiva média foram calculados valores de R. Foram ainda calculados os valores máximos de R (Rmax) por grupo etário (quadro 3.4).

Quadro 3.4 - Valores máximos de R por grupo etário.

Grupo etário	Cys	Orn	Lys	Arg
0 - 1 M	1,0	2,4	2,2	2,0
1 - 6 M	2,0	2,2	2,9	1,6
6 - 12 M	1,8	2,0	1,9	1,8
1 - 2 A	1,8	2,0	2,0	2,0
2 - 4 A	2,4	2,3	1,6	2,3
4 - 7 A	2,2	2,3	2,2	2,3
7 - 10 A	2,1	2,3	1,8	2,3
10 - 13 A	2,1	3,0	2,2	3,0
> 13 A	2,9	3,0	3,2	3,0

Legenda: M - meses, A - anos.

Os valores de Rmax servem-nos para definir um *cutt-off* para a cistina e seleccionar o valor a partir do qual consideramos que a excreção está alterada. Assim, os doentes referidos em material e métodos no ponto 2.1 como assintomáticos (D1/FB, D1/FG, D1/FH e D1/FL) e cujas idades actuais são respectivamente 10, 3, 7 e 9 anos têm valores de R para cistina de 2,5; 6,1; 21,6 e 4,1 sendo todos superiores ao Rmax calculado para a população normal.

Poderíamos considerar que D1/FG tem uma situação no limite da normalidade e por conseguinte difícil de classificar, no entanto se observarmos o R calculado para a lisina verificamos que é superior a 20 (Rmax lisina 2,2), pelo que este indivíduo apesar de assintomático tem critérios bioquímicos de inclusão no estudo.

Com base nos valores de R calculados para o grupo em estudo foram elaborados três gráficos: o primeiro com os casos índice (figura 3.2), o segundo com os progenitores (figura 3.3) e um terceiro com os restantes familiares (figura 3.4).

Foram também calculados os somatórios dos *ratios* estabelecidos para a cistina, ornitina, lisina, arginina.

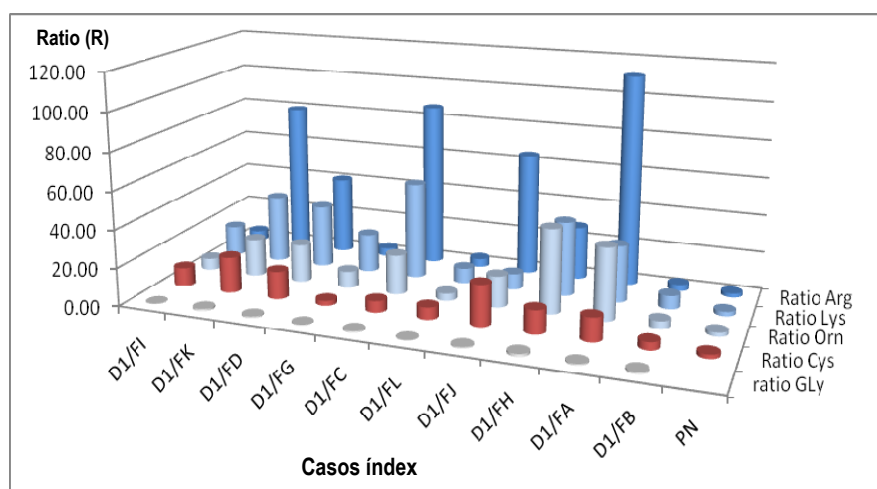


Figura 3.2 - *Ratios* da concentração de glicina (Gly), gistina (Cys), ornitina (Orn), lisina (Lys) e arginina (Arg) e a média da população de referência. Para 10 dos casos index (D1). PN – População normal (valor calculado com 100 controlos).

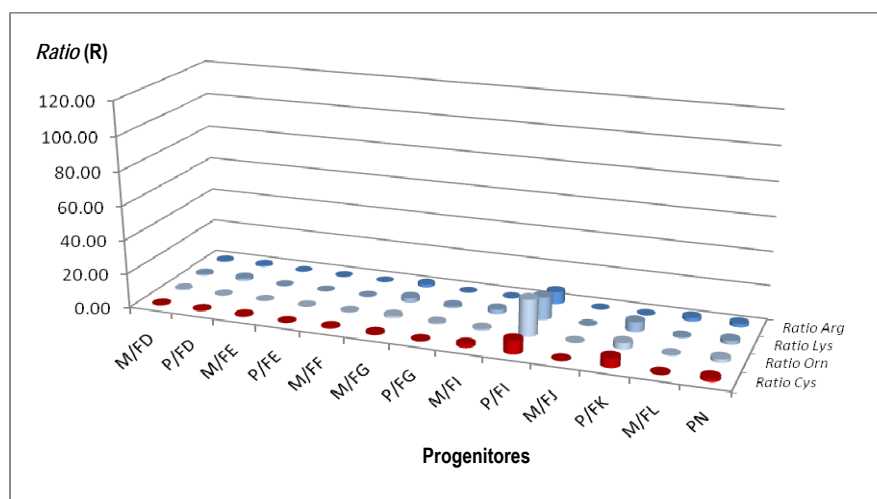


Figura 3.3 - *Ratios* da concentração de cistina (Cys), ornitina (Orn), lisina (Lys) e arginina (Arg) e a média da população de referência. Para 12 progenitores. PN – População normal (valor calculado com 100 controlos).

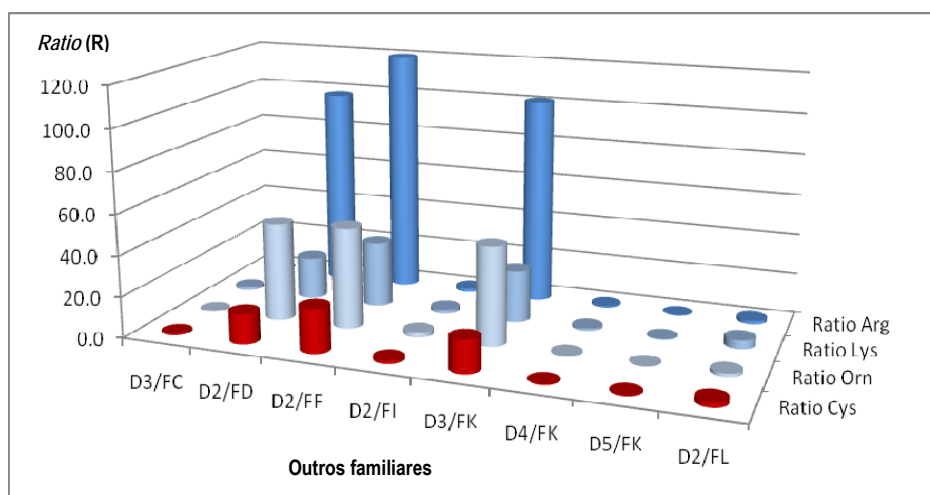


Figura 3.4 - *Ratios* da concentração de glicina (Gly), cistina (Cys), ornitina (Orn), lisina (Lys) e arginina (Arg) e a média da população de referência. Para 8 familiares (D2, D3, D4, D5). PN – População normal (valor calculado com 100 controlos).

Estes gráficos permitem visualizar as marcadas diferenças de excreção de cistina e aminoácidos básicos entre doentes e população normal, isto independentemente das unidades em que estavam expressas as concentrações. Permitem também verificar quais os progenitores que apresentam fenótipo (P/FI, P/FK) e identificar potenciais doentes entre os restantes familiares (D2/FD, D2/FF e D3/FK).

3.3. Estudo mutacional

Foram selecionados para investigação molecular uma dúzia de doentes cistinúricos com base em critérios clínicos e bioquímicos. O estudo consistiu, numa primeira fase, na sequenciação das regiões codificantes dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*, nos 12 casos index com o objectivo de detectar mutações causais. Posteriormente, foram estudados os familiares acessíveis, estabelecidos os modos de transmissão e, quando se justificava, foram efectuados estudos adicionais.

Os resultados encontrados serão apresentados primeiro na generalidade e depois família a família. Sempre que possível, serão relacionadas entre si as alterações encontradas em diferentes famílias.

De acordo com a informação disponibilizada (quadro 2.1), há dez familiares de seis doentes com litíase. Analisamos a urina de sete e verificamos que só em cinco havia aumento da excreção de cistina e aminoácidos básicos (D2/FD, D2/FF, D3/FK, P/FI e P/FK), pelo que existirão outras causas para a litíase pelo menos em dois indivíduos (P/FD e P/FE).

3.3.1. Resultados gerais da sequenciação

Nos quadros 3.5 e 3.6 estão referidas todas as alterações encontradas nos genes *SLC3A1* e *SLC7A9* respectivamente, no decurso deste trabalho indicando-se a sua localização no cDNA, gDNA e fontes bibliográficas / bases de dados relacionadas.

Quadro 3.5 - Alterações encontradas no decurso deste trabalho no gene *SLC3A1*.

Localização c.DNA	g.DNA	Substituição nucleotídica	Variação	Tipo de alteração	Referência
c.114	exão 1	A>C	p.G38G	SNP	http://www.ensembl.org
c.231	exão 1	T>A	p.S77S	SNP	http://www.ensembl.org
c.611-2	intrão 3	A>C	c.611-2A>C	<i>Splicing</i>	Neste estudo
c.647	exão 3	C>T	p.T216M	<i>Missense</i>	Bisceglia et al, 1996
c.797	exão 4	T>C	p.F266S	<i>SNP?</i>	Chatzikiyiakidou et al, 2004
c.1035	exão 6	G>A	p.E345E	SNP	Christa Schmidt et al, 2004
c.1136+44	intrão 6	G>A	c.1136+44G>A	SNP	Neste estudo
c.1136+3	intrão 6	T/-	c.1136+3delT	SNP	http://www.ensembl.org
c.1190	exão 7	A>G	p.Y397C	<i>Missense</i>	Neste estudo
c.1332+7	intrão 7	C>T	c.1332+7C>T	SNP	http://www.ensembl.org
c.1400	exão 8	T>C	p.M467T	<i>Missense</i>	Calonge et al, 1994
c.1597	exão 10	T>A	p.Y533N	<i>Missense</i>	Neste estudo
c.1854	exão 10	G>A	p.M618I	SNP	http://www.ensembl.org
c.2019	exão 10	C>G	p.C673W	<i>Missense</i>	Bisceglia et al, 2001
c.*70A	3'UTR	A>G	c.*70A>G	SNP	Neste estudo

Legenda: A preto estão indicados os polimorfismos descritos nas bases de dados e/ou bibliografia, a vermelho as mutações causais descritas previamente e a verde as alterações descritas pela primeira vez neste trabalho.

Quadro 3.6 - Alterações encontradas no decurso deste trabalho no gene *SLC7A9*.

Localização c.DNA	g.DNA	Substituição nucleotídica	Variação	Tipo de alteração	Referência
c.-39	5'UTR	C>T	c.-39C>T	SNP	http://www.ensembl.org
c.216	exão 3	C>T	p.C72C	SNP?	Neste estudo
c.235	intrão 3	T>G	c.235+22T>G	SNP	http://www.ensembl.org
c.399	exão 4	C>T	p.S133S	SNP	http://www.ensembl.org
c.411	exão 4	T>C	p.C137C	SNP	http://www.ensembl.org
c.425	exão 4	T>C	p.V142A	SNP?	Shigeta et al, 2006
c.478+10	intrão 4	T>C	c.478+10T>C	SNP	http://www.ensembl.org
c.507	exão 5	C>T	p.S169S	SNP	http://www.ensembl.org
c.562	exão 5	G>A	p.V188M	<i>Missense</i>	Font-Llitjos et al, 2005
c.604+1	intrão 5	G>A	c.604+1G>A	<i>Splicing</i>	ICC; 2001
c.604+10	intrão 5	G>A	c.604+10G>A	SNP	http://www.ensembl.org
c.604+24	intrão 5	T>C	c.604+24T>C	SNP	http://www.ensembl.org
c.614_615insA	exão 6	-/A	c.614_615insA	<i>Framshift</i>	Leclerc et al, 2001
c.667	exão 6	C>A	p.L223M	SNP?	Shigeta et al, 2006
c.687	exão 6	C>T	p.L229L	SNP	http://www.ensembl.org
c.874-39	intrão 8	A>G	c.874-39A>G	SNP	http://www.ensembl.org
c.972	exão 10	G>A	p.A324A	SNP?	Neste estudo
c.977	intrão 9	A>G	c.977+51A>G	SNP	http://www.ensembl.org
c.1074+68	intrão 10	C>T	c.1074+68C>T	SNP	http://www.ensembl.org
c.1119	exão 11	G>A	p.S373S	SNP	Neste estudo
c.1143	exão 11	C>A	p.A381A	SNP	http://www.ensembl.org
c.1365	exão 12	C>T	p.V455V	SNP	http://www.ensembl.org
c.1399+3delAGTA	intrão 12	AGTA/-	c.1399+3delAGTA	<i>Splicing</i>	ICC; 2001
c.* 82	3'URT	C>T	c.*82C>T	SNP?	Neste estudo

Legenda: A preto estão indicados os polimorfismos descritos nas bases de dados/bibliografia, a vermelho as mutações causais descritas previamente, a verde as alterações descritas pela primeira vez neste trabalho, a azul as variações descritas quer como mutações quer como SNP e a laranja uma alteração descrita como SNP mas que neste trabalho se demonstra que provoca alteração ao nível do mRNA.

3.3.2. Alterações não descritas na literatura

3.3.2.1. Gene *SLC3A1*

No decurso da sequenciação do gene *SLC3A1* encontraram-se 15 alterações na sequência de referência (ENSG00000138079), cinco das quais não tinham sido previamente referidas por nenhum autor. Por esse motivo serão seguidamente descritas com maior detalhe.

3.3.2.1.1. Alteração c.611-2A>C

Esta alteração (figura 3.5) localizada no final do intrão 3 (na sequência consenso de *splicing*) estava presente em heterozigotia num caso index (D1/FF). Nesse doente foi também identificada uma mutação patogénica, previamente descrita na literatura, permitindo desta forma classificá-lo, a nível molecular, como sendo um heterozigoto composto.

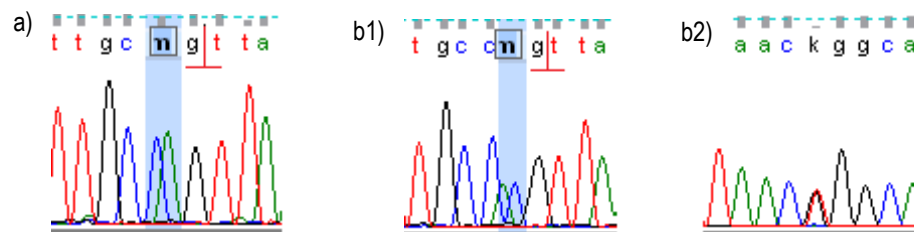


Figura 3.5 - Representação parcial da sequenciação do gDNA (a) normal e (b1) com a mutação c.611-2A>C no intrão 3 (b2) com a mutação c.611-2A>C mas sequenciado na cadeia complementar para melhor visualização da heterozigotia. A vermelho assinala-se o local consenso de *splicing* afectado.

Contudo antes de considerar esta alteração como mutação causal foi feita a sua pesquisa em 200 alelos da população normal por *High Resolution Melting Curve Analysis* (hrMCA) (figura 3.6), não tendo sido identificado nenhum portador.

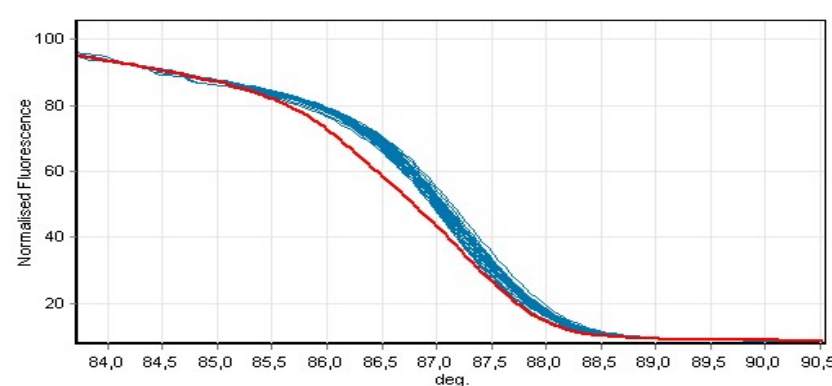


Figura 3.6 - Curva de *melting* obtida na metodologia hrMCA. A vermelho destacam-se dois controlos positivos (heterozigotos) e a azul estão as curvas de *melting* dos controlos normais testados.

Foi também efectuada uma simulação nos softwares *Human Splicing Analyser* e *GENSCAN* (que permitem prever se uma alteração será passível de provocar uma modificação no *splicing*, e no caso do *GENSCAN* qual o padrão de *splicing* resultante da alteração) para averiguar as consequências desta variação ao nível da sequência proteica, tendo-se verificado que dá origem a um transcrito alternativo (figura 3.7) que resulta no *skipping* do exão 3 e por conseguinte numa proteína com supressão de 52 aminoácidos.

Esta alteração (c.611-2A>C) foi considerada patogénica em função dos resultados obtidos.

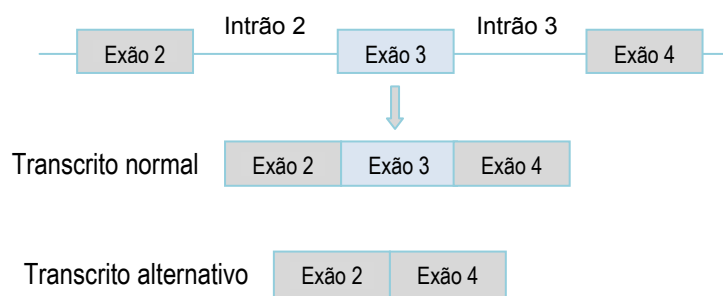


Figura 3.7 - Representação esquemática do *skipping* do exão 3 causado pela presença da alteração c.611-2A>C no gene *SLC3A1*.

3.3.2.1.2. Alteração c.1136+44G>A

Esta alteração intrónica, c.1136+44G>A (figura 3.8) foi identificada em 3 famílias distintas. É uma variação afastada dos locais de *splicing*, contudo uma vez que apareceu em vários doentes aprofundou-se um pouco mais o conhecimento sobre a sua natureza. A sua eventual patogenicidade foi investigada extraíndo RNA dos leucócitos e procedendo-se depois à síntese de cDNA e sua sequenciação, contudo não foi observada qualquer alteração na sequência do cDNA concluindo-se que é uma alteração silenciosa (SNP).

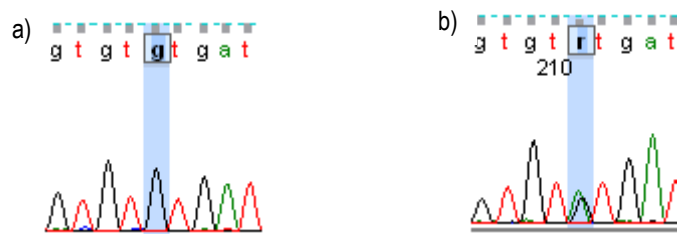


Figura 3.8 - Representação parcial da sequenciação do gDNA (a) normal e (b) com a alteração c.1136+44G>A.

3.3.2.1.3. Alteração c.1190A>G (p.Y397C)

Esta alteração (detectada na família D1/FA), localiza-se no exão 7 e corresponde à substituição do codão TAT por TGT com conseqüente incorporação do aminoácido cisteína na posição 397 da proteína em vez da tirosina da proteína nativa (figura 3.9). Esta alteração implica a existência na seqüência proteica de um grupo polar –SH extra com potencial para formar ligações dissulfureto, e modificar a conformação espacial da proteína, afectando a sua função.

Procedeu-se ao estudo populacional por hrMCA (200 alelos), não tendo sido detectado nenhum portador.

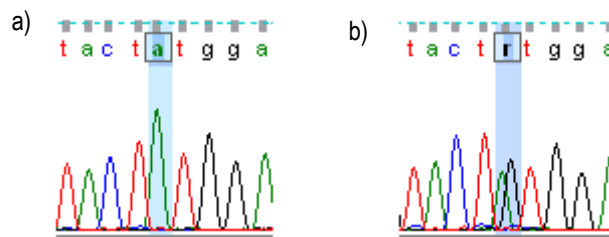


Figura 3.9 - Representação parcial da sequenciação do gDNA (a) normal e (b) em heterozigotia para a mutação c.1190A> G (p.Y397C).

O alinhamento da seqüência com outras espécies é também a favor de mutação causal, uma vez que a alteração ocorre numa zona altamente conservada da proteína (figura 3.10).

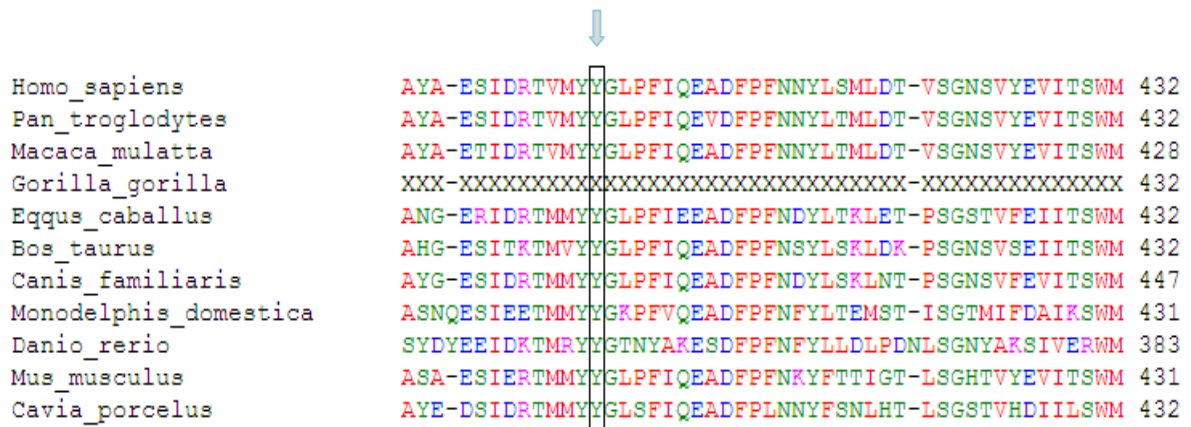


Figura 3.10 - Alinhamentos de parte da seqüência da proteína rBAT humana com as seqüências de outros organismos, em torno da mutação p.Y397C. O resíduo aminoacídico em causa está assinalado e é altamente conservado. O alinhamento das seqüências de aminoácidos foi efectuado com o software *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Espécies utilizadas: *Pan troglodytes* (chimpanzé); *Macaca mulatta* (macaco rhesus5); *Gorilla gorilla* (Gorila); *Equus caballus* (cavalo); *Bos taurus* (boi); *Canis familiaris* (cão); *Monodelphis domestica* (opossum cinzento de cauda curta); *Danio rerio* (peixe zebra); *Mus musculus* (rato doméstico); *Cavia porcellus* (porquinho-da-índia).

Recorrendo aos programas *PolyPhen* (*Polymorfism Phenotyping*) e *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*) foi feito um levantamento de previsão de patogenicidade a nível de estrutura proteica (quadro 3.7).

O *PolyPhen* é uma aplicação informática que permite prever o possível impacto da substituição de um aminoácido por outro na estrutura e função de uma proteína. Esta previsão baseia-se em regras empíricas directas, que são aplicadas à sequência e à informação estrutural e filogénica que caracterizam a substituição. As alterações podem ser classificadas como (i) *provavelmente deletérea* (caso seja possível dizer, com um grau de confiança muito elevado que a estrutura e função da proteína serão afectadas), (ii) *benigna* (caso o mais provável seja a alteração não ter efeitos) ou (iii) *desconhecida* (quando o programa não consegue estabelecer uma previsão). Os scores variam entre 0 e um número positivo em que 0 corresponde a uma alteração neutra, e um número positivo elevado, a uma elevada probabilidade da alteração ser prejudicial.

O programa *Sorting Intolerance From Tolerant* (*SIFT*) prevê, com base na análise de sequências homólogas, se uma determinada substituição aminoacídica será deletérea para a proteína ou se, pelo contrário, poderá ser tolerada. Esta aplicação baseia-se no pressuposto de que há correlação entre a evolução da proteína e a função que ela assume. Assim, posições importantes para a função deverão aparecer conservadas quando se faz o alinhamento de proteínas da mesma família, enquanto que as posições menos importantes poderão variar. Valores menores do que 0,05 indicam que a alteração é patogénica e não será tolerada e valores iguais ou superiores a 0,05 apontam para que o seja.

Quadro 3.7 - Valores obtidos na previsão do impacto a nível funcional da mutação c.1190A>G (p.Y397C) através da aplicação dos programas *PolyPhen* e *SIFT*.

Mutação	Alteração na sequência proteica	Previsão	
		<i>Polyphen</i>	<i>SIFT</i>
c.1190A>G	p.Y397C	3.065	0.00
		provavelmente deletéria	deletéria

Dada a natureza da substituição, a sua localização numa zona conservada em termos evolutivos e os resultados obtidos, na aplicação dos programas *PolyPhen* e *SIFT* esta alteração encontrada em heterozigotia num doente cistinúrico (D1/FA) foi considerada patogénica.

3.3.2.1.4. Alteração c.1597T>A (p.Y533N)

Esta alteração localiza-se no exão 9 e foi encontrada em homozigotia num só doente (D1/ FC).

Neste caso a substituição de uma timina por uma adenina no nucleótido 1597 do cDNA, (figura 3.11) implica que na sequência proteica seja incorporada uma asparagina na posição 533 em vez da tirosina. Por conseguinte na posição habitual de um aminoácido aromático polar com potencial para ganhar uma carga positiva é incorporado um aminoácido neutro, ocorrendo esta alteração num local altamente conservado da proteína (figura 3.12).

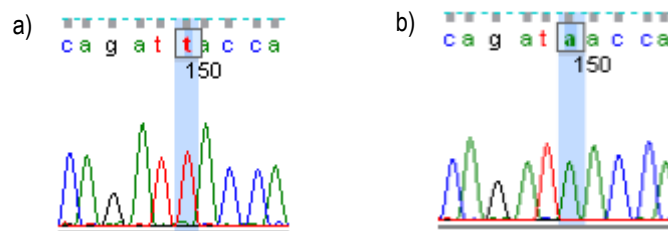


Figura 3.11 - Representação parcial da sequenciação do gDNA (a) normal e (b) e com a mutação c.1597T>A (p.Y533N) em homozigotia.

A comparação da homologia da sequência proteica humana com sequências de outros organismos está representada na figura 3.12.



Figura 3.12 - Alinhamentos de parte da sequência da proteína rBAT humana, com as sequências de outros organismos, em torno da mutação Y533N. O resíduo aminoácido em causa está assinalado. O alinhamento dos aminoácidos foi efectuado com o software *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Espécies utilizadas: *Pan troglodytes* (chimpanzé); *Macaca mulatta* (macaco rhesus5); *Gorilla gorilla* (Gorila); *Equus caballus* (cavalo); *Bos taurus* (boi); *Canis familiaris* (cão); *Monodelphis domestica* (opossum cinzento de cauda curta); *Danio rerio* (peixe zebra); *Mus musculus* (rato doméstico); *Cavia porcellus* (porquinho-da-índia).

Tal como no caso anterior, a avaliação hipotética do impacto da mutação, foi efectuada recorrendo a dois *softwares*: o *Polyphen* e o *SIFT* e ambos os programas indicam que c.1597T>A (p.Y533N) é uma alteração com consequências para a funcionalidade da proteína (quadro 3.8).

Por tudo o acima referido esta alteração foi considerada patogénica. A pesquisa desta mutação em 200 alelos da população controlo, por hrMCA, não detectou nenhum portador.

Quadro 3.8 - Valores obtidos na previsão do impacto da mutação c.1597T>A (p.Y533N) para a função da proteína, através da aplicação dos programas *Polyphen* e *SIFT*.

Mutação	Alteração na sequência proteica	Previsão	
		<i>Polyphen</i>	<i>SIFT</i>
c.1597T>A	p.Y533N	3.110	0.02
		provavelmente deletéria	deletéria

3.3.2.1.5. Alteração c.*70A>G

Esta alteração localiza-se na região não traduzida (UTR), na extremidade 3' do gene *SLC3A1* e foi identificada em heterozigotia em 3 doentes (figura 3.13).

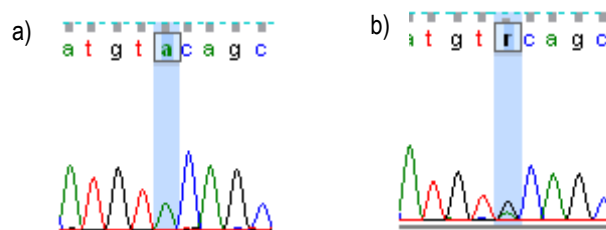


Figura 3.13 - Representação parcial da sequenciação do gDNA (a) normal e (b) e com a alteração c.*70A>G em heterozigotia.

Seguidamente foi feita a sua pesquisa por hrMCA em 50 indivíduos controlo na população portuguesa tendo sido encontrados 5 portadores.

Os resultados são a favor de um alelo variante não patogénico com uma frequência alélica (próxima) de 5% na população normal, pelo que esta alteração foi considerada um provável polimorfismo (SNP).

3.3.2.2. Gene *SLC7A9*

A sequenciação do gene *SLC7A9* permitiu identificar 24 alterações à sequência de referência (**ENSG00000021488**), três das quais são novas.

3.3.2.2.1. Alteração c.216C>T (p.C72C)

Esta alteração não descrita na literatura, localiza-se no exão 3 (figura 3.14) e foi detectada em heterozigotia num doente cistinúrico (D1/FF). Esta alteração resulta da substituição da citosina pela timina na posição 216 e provoca a substituição do triploto TGC pelo TGT, codificando ambos para o aminoácido cisteína na posição 72.

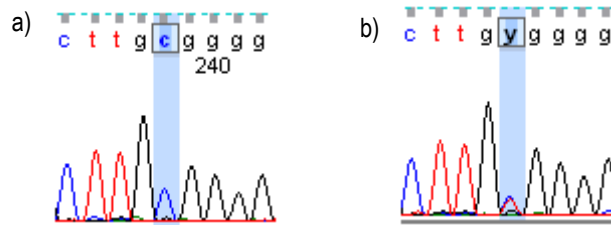


Figura 3.14 - Representação parcial da sequência do gDNA de uma amostra (a) normal e de (b) outra com heterozigotia para a alteração c.216C>T (p.C72C).

Recorreu-se aos *softwares* simuladores de *splicing* já anteriormente referidos *Human Splicing Analyser* e *GENSCAN* para avaliar a possibilidade de esta variação interferir com regiões consenso que provocam alteração de *splicing*, a qual parece não ocorrer.

A sua pesquisa em 100 controlos da população portuguesa por hrMCA foi negativa e uma vez que se trata da substituição de um triploto por outro que codifica para o mesmo aminoácido (cisteína) os resultados são a favor de uma alteração neutra rara.

3.3.2.2.2. Alteração c.1119G>A (p.S373S)

Esta alteração localizada no exão 11 do gene *SLC7A9* foi detectada em 3 membros de uma família (FL) em heterozigotia e corresponde à substituição do codão TCG pelo TCA, ambos codificantes para o aminoácido serina na posição 373 (figura 3.15).

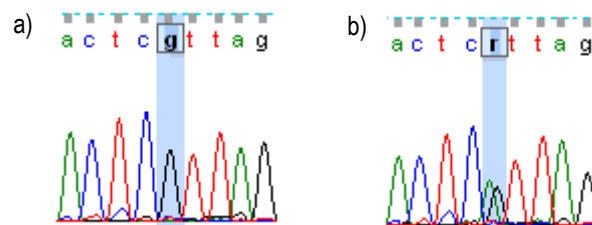


Figura 3.15 - Representação parcial da sequência do gDNA (a) normal (b) e com a alteração c.1119G>A (p.S373S) em heterozigotia.

Foram testados 100 indivíduos da população portuguesa pela técnica hrMCA, não tendo sido detectado o alelo alterado.

Esta alteração foi encontrada num doente em que foi extraído RNA e sintetizado cDNA, o qual foi depois sequenciado tendo sido possível comprovar que a alteração c.1119G>A não provoca alteração na sequência proteica nem do processamento do mRNA.

Esta variação não parece ter consequências patológicas, pelo que será considerada como um variante neutro raro.

3.3.2.2.3. Alteração c.*82C>T

Esta alteração ocorre na região não traduzida em 3' (3'UTR) e tal como a alteração c.*70A>G, anteriormente descrita no gene *SLC3A1*, esta variação não acarreta qualquer alteração na sequência proteica, pode contudo interferir com sequências reguladoras nesta extremidade, uma vez que nesta extremidade existem locais para interação com proteínas que afectam a estabilidade e localização do mRNA.

Foi detectada em três membros de uma família (FD) em heterozigotia (figura 3.16).

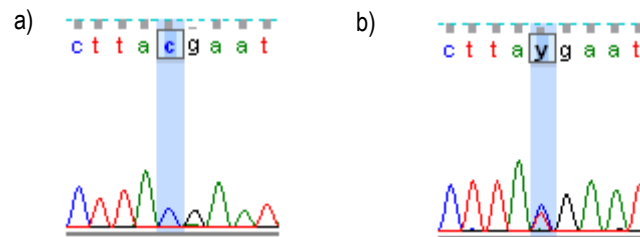


Figura 3.16 - Representação parcial da sequência do gDNA (a) normal (b) e com a alteração c.*82C>T em heterozigotia.

Foi realizado um rastreio populacional em 100 controlos (200 alelos), que não revelou nenhum alelo mutado.

Atendendo a que ela foi transmitida em *cis* com a mutação patogénica c.1400T>C na família D, provavelmente não tem significado patológico.

3.3.3. Alterações descritas na literatura

No presente trabalho foram encontradas 31 alterações previamente descritas na literatura: umas consideradas mutações causais, outros polimorfismos e outras com dupla classificação consoante o autor e a abordagem, mais ou menos pormenorizada, das consequências funcionais da variação de sequência.

Tivemos oportunidade de aprofundar o acaso da alteração p. A324A considerada um SNP modificador da expressão genética por Chatzikyriakidou *et al*, 2006).

3.3.3.1. Investigação da variação c.972G>A (p.A324A)

Chatzikyriakidou e colaboradores publicaram em 2006 um trabalho em que defendem que a presença de determinados polimorfismos no gene *SLC7A9* podem ter consequências a nível funcional. Segundo estes autores dois polimorfismos em *cis* entre si e em *trans* em relação a uma mutação patogénica podem, contribuir para a expressão da doença com dominância incompleta. Uma das variações referidas é a c.972G>A, embora não explique porquê. Neste trabalho a alteração em causa foi encontrada em três famílias com cistinúria tendo sido investigada ao nível do cDNA.

Constatou-se que a variação p.A324A aparentemente silenciosa origina uma deleção de 4 nucleótidos (GCAG) no cDNA, na zona correspondente ao exão 9, com consequências ao nível da grelha de leitura para a síntese proteica (fig 3.17).

Recorreu-se ao software *Human Splicing Analyser* para clarificar a situação efectuando a previsão de *splicing* da nova sequência. Verificou-se que a presença da alteração activa uma sequência críptica. Na presença da sequência mutante o *score* deste local subiu de 0,78 para 2.53 indicando que se formou um local alternativo de *splicing*. Assim, parece-nos que a presença da alteração c.972G>A poderá levar a maquinaria de *splicing* a reconhecer para além do local original um novo local críptico a montante (fig 3.18). As previsões apontam para que se crie um *frameshift* que dê origem a uma proteína truncada (p.Gly325AspfsX36) com perda de 289 resíduos de aminoácidos. É possível que os dois locais de *splicing* sejam usados de modo alternativo pelas células, uma vez que a alteração está presente em heterozigotia, e que *in vivo* haja uma quantidade significativa de moléculas de RNA a serem processadas pelo local de *splicing* correcto. A clarificação desta situação requeriria efectuar uma biópsia renal e quantificar os dois RNAs mensageiros nas células tubulares renais.

Atendendo a que apareceu em três famílias, e já está descrita na bibliografia, levanta-se a questão se será esta alteração frequente nos doentes com cistinúria ou se será comum na população geral. Ainda não nos foi possível efectuar o estudo populacional para responder a esta questão.

Dadas as consequências para a sequência proteica que esta alteração ocasiona, deveria ser considerada mutação patogénica.

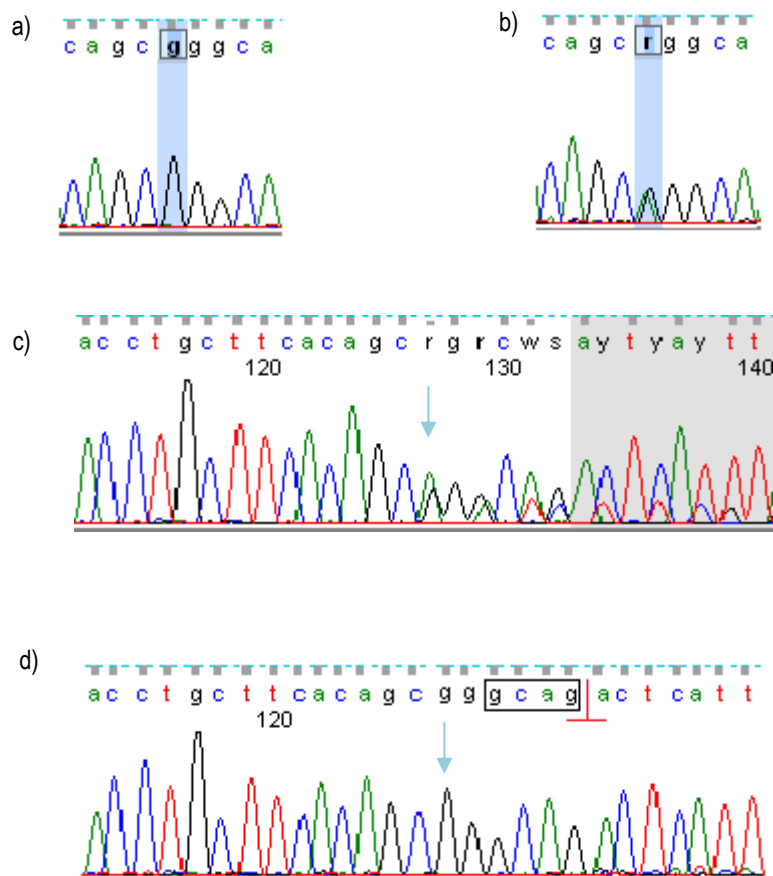


Fig. 3.17 - Mutação c.972G>A (p.A324A). a) Sequência parcial do gDNA do gene *SLC7A9* de um indivíduo controle normal. b) Sequência parcial, onde se pode observar a presença da mutação em heterozigotia. c) Sequência parcial do exão 9 do cDNA afectada pela presença do polimorfismo descrito c.972G>A (p.A324A). d) Sequência parcial de cDNA num controle normal, onde podemos visualizar a zona delectada na presença da alteração e a região de junção do exão 9 ao exão10.

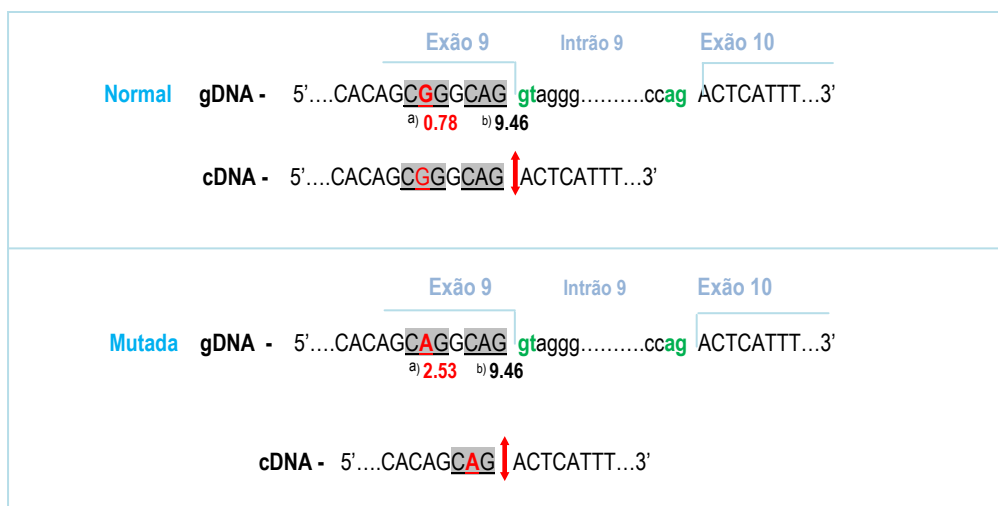


Fig. 3.18 - Contexto associado à alteração p.A324A, na sequência normal e mutada. a) *score* obtido na programa *Human Splicing Analyser*, associado ao motivo onde ocorre a substituição c.972G>A, na sequência normal e mutante. b) *score* obtido na programa *Human Splicing Analyser*, associado ao motivo natural de *splicing*, na sequência normal e mutante. Dado os *scores* encontrados ambos os locais podem ser reconhecidos *in vivo*.

Da análise do artigo de Chatzikyriakidou, em que refere 15 polimorfismos que podem alterar a expressão genética na cistinúria, salienta-se a variação p.A381A (c.1143C>A), detectada em heterozigotia num doente cistinúrico (D1/FB), que será objecto de análise similar à efectuada como a p.A324A.

3.4. Caracterização das famílias com cistinúria

Nesta investigação trabalhamos sobre um grupo de 12 famílias. Em 2/12 só foi possível aceder ao caso índice, em 5/12 além do caso índice foram estudados ambos os progenitores, em 4/12 só um dos progenitores e em 6/12 tivemos acesso a outros familiares. Em 6/12 havia registo de mais familiares com cálculos renais.

O ICC propôs uma classificação genética dos doentes em contraposição às classificações bioquímicas prévias referidas em 1.7.1. e aplicadas em 3.2 (quadro 3.3). Podemos designar os doentes como sendo tipo A se possuem dois alelos mutados para o gene *SLC3A1*, tipo B se possuem dois alelos mutados para o gene *SLC7A9* e tipo AB se são formas de hereditariedade digénica, isto é possuem um alelo mutado em cada gene. Poderão ainda existir casos mistos raros com duas mutações num dos genes e uma no outro gene (AAB e BBA).

Para efeitos de simplificação, na abordagem das famílias, e para cada uma delas, serão apresentados quadros onde constam as alterações causais, as novas e as alterações que embora reduzam a actividade transportadora da proteína, não alteram o fenótipo, pelo que serão designadas neste trabalho de “alterações não silenciosas”. Nos quadros 3.9 a 3.20 foi adoptada a simbologia ↑↑ (para designar uma excreção marcada de cistina), ↑ (para um aumento moderado) e → (para uma excreção normal). Os alelos normais serão designados pela letra N.

Foram elaborados haplótipos das famílias, e sempre que se justifique, serão apresentados. A codificação utilizada para a construção destes haplótipos é a que consta dos anexos 7 e 8.

3.4.1. Família A

Nesta família só foram estudados o caso índice (D1/FA) e a mãe (M/FA).

Quadro 3.9 - Resultados da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9* na família A.

Gene	D1/FA ↑↑	M/FA	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.647C>T /N	N/N	<i>Missense</i>
	c.1190A>G/N	c.1190A>G/N	<i>Missense</i> (não descrita)

A sequenciação do gene SLC3A1 revelou a presença de duas mutações: uma no exão 3 (c.647C>T ou p.T216M) previamente descrita e outra, no exão 7 (c.1190A>G ou p.Y397C), herdada por via materna que não está referida na literatura. Foram feitas simulações de patogencidade e alinhamento da sequência com outras espécies (3.3.2.1.3.) que são a favor de uma mutação *missense* causal. Além disso, o valor de excreção de cistina urinária elevado (R=12.4). Neste doente a classificação genética é de homocigoto tipo A (AA).

A sequenciação do gene SLC7A9 apenas revelou a presença de um polimorfismo descrito em heterocigotia.

3.4.2. Família B

Não foi possível aceder aos progenitores do doente D1/FB, pelo que o estudo se limitou ao caso índice.

Quadro 3.10 - Resultados da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9* na família B.

Genes	D1/FB ↑	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.1136+44G>A/N	SNP (não descrita)
<i>SLC7A9</i>	c.614_615insA/N	<i>Splicing</i>

No gene SLC3A1 o doente apresenta uma variação intrónica c.1136+44G>A afastada 44 nucleótidos do local de *splicing*, a qual foi descrita pela primeira vez neste trabalho (3.3.2.1.2.) em cinco famílias (FB, FE, FG, FI e FJ) e tratada como sendo um polimorfismo.

A sequenciação do gene SLC7A9 revelou a presença da mutação patogénica já descrita c.614_615insA (Leclerc *et al*, 2001) em heterocigotia. Como este doente é assintomático (não apresenta litíase), tendo sido diagnosticado casualmente do decurso da investigação clínica de um atraso cognitivo e tem um aumento moderado da excreção de cistina urinária (R=6.0) é compatível com uma classificação de heterocigoto tipo B.

3.4.3. Família C

Quadro 3.11 - Resultados obtidos na família C através da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

Genes	D1/FC ↑↑	D3/FC →	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.1597T>A / c.1597T>A	c.1597T>A/N	<i>Missense</i> (não descrita)
<i>SLC7A9</i>	c.425T>C/N	c.425T>C/N	SNPs "não silenciosos"
	c.667C>A/N	c.667C>A/N	

O doente D1/FC apresenta uma excreção marcada de cistina na urina (R=25.6) compatível com uma forma homozigótica de cistinúria, enquanto que o seu irmão não tem sintomas e excreta níveis normais de cistina na urina (R=0.6). Estes resultados estão em concordância com o facto de o estudo do gene SLC3A1 revelar que o doente é homozigoto para uma variação não descrita na literatura (c.1597T>A ou p.Y533N), com elevada probabilidade de ser patogénica (3.3.2.1.4) e o irmão ser heterozigoto para a mesma mutação.

Ambos são portadores das duas variações em heterozigotia no gene SLC7A9 de classificação não consensual c.425T>C (p.V142A) e c.667C>A (p.L223M), que de acordo com a literatura já foram classificadas como polimorfismos (Daniel Leclerc *et al*, 2002; Y Shigeta *et al*, 2006), no entanto figuram na base de dados HGMD como mutações (Y Shigeta *et al*, 2006). Estes últimos autores fizeram estudos funcionais para averiguar o efeito destas alterações na actividade de transporte da cistina, uma vez que apareciam também em indivíduos normais, e verificaram que quer a p.V142M, quer a p.L223M individualmente, faziam diminuir o transporte de cistina quando comparado com o *Wild-type*, embora nunca de um modo muito significativo. Esta situação era mais evidente quando ambas as variações estavam presentes no mesmo alelo não atingindo contudo um valor de 50% em relação ao *Wild-type*.

O facto de não terem sido estudados os progenitores impossibilita avaliar se as duas variações estão sobre o mesmo alelo ou em alelos distintos. É de referir que a conjugação destes dois “polimorfismos não silenciosos” parece não agravar o fenótipo, uma vez que D3/FC tem uma excreção de cistina normal.

O doente D1/FC classificado bioquimicamente como homozigoto tipo I pode, após o presente estudo molecular, ser também classificado em termos genéticos como tipo A (AA).

3.4.4. Família D

Quadro 3.12 - Resultados obtidos na família D através da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

Genes	D1/FD ↑↑	D3/FD ↑↑	P/FD →	M/FD →	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.1400T>C/N	c.1400T>C/N	N/N	c.1400T>C/N	<i>Missense</i>
	c.*70A>G/N	c.*70A>G/N	c.*70A>G/N	c.*70A>G/N	SNP (não descrita)
<i>SLC7A9</i>	c.425T>C/N	c.425T>C/N	N/N	c.425T>C/N	SNPs “não silenciosos”
	c.667C>A/N	c.667C>A/N	c.667C>A/N	N/N	
	c.* 82C>T/N	c.* 82C>T/N	N/N	c.* 82C>T/N	SNP? (não descrita)

O *screening* para pesquisa de alterações causais revelou a presença da mutação descrita na literatura c.1400T>C (p.M467T) no gene *SLC3A1* em heterozigotia no caso índice (D1/FD), no irmão (D3/FD) e na mãe (M/FD). Esta mutação *missense* substitui o aminoácido metionina por treonina no codão 467 e está descrita como sendo a mais comum no gene *SLC3A1* (Manuel Palacín *et al*, 2001). Os estudos funcionais realizados demonstraram que esta alteração de domínio extracelular no mutante de rBAT, apesar de conseguir ligar-se eficientemente com b^{0,+}AT é no entanto posteriormente degradado, ficando assim a actividade de transporte reduzida (Paola Bartocioni *et al*, 2008). Adicionalmente foram detectadas no gene *SLC7A9* as alterações, já referidas anteriormente na família C, c.425T>C (p.V142A) e c.667C>A (p.L223M), ambas em heterozigotia, em todos os elementos da família.

Nesta família também foi detectada a presença de duas alterações não descritas, em heterozigotia, uma no gene *SLC3A1* (c.*70A>G) e uma no gene *SLC7A9* (c.*82C>T). Todos os membros da família são portadores destas alterações, excepto o pai que apenas é portador da primeira.

Conforme já referido anteriormente (3.3.2.1.5. e 3.3.2.2.3.), foi realizado um rastreio populacional em 100 controlos (200 alelos) nas alterações não descritas c.*70A>G e c.*82C>T. Constatou-se que a primeira alteração é a favor de um SNP uma vez que foi detectada em indivíduos da população normal, mas a segunda permanece por esclarecer porque não foi detectada nos 200 alelos estudados.

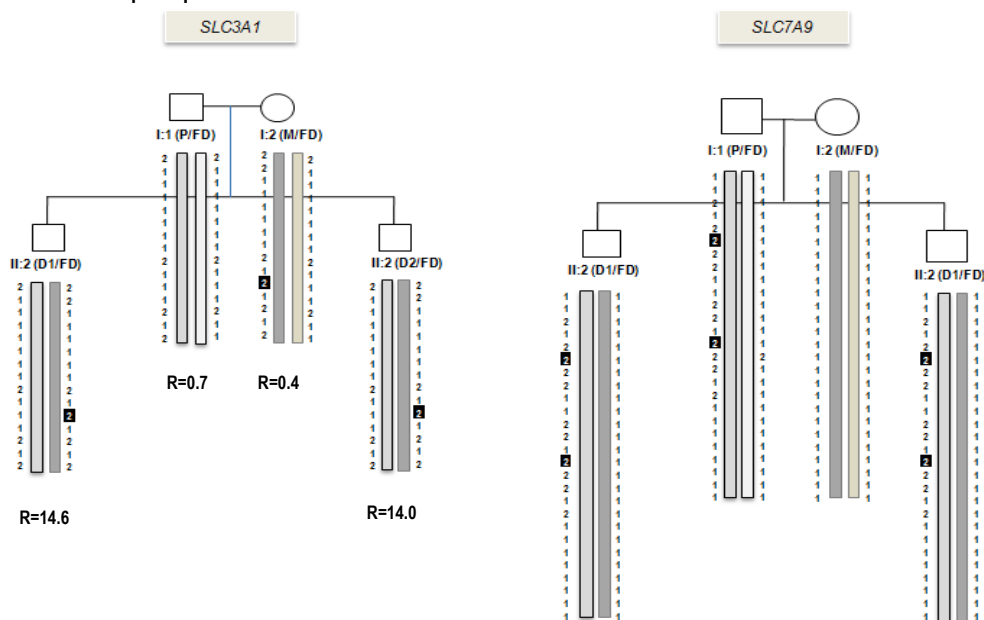


Figura 3.19 - Haplótipos estabelecidos para ambos os genes com base nas alterações de sequência encontradas na família D. No gene *SLC3A1* está assinalado, com fundo preto, a transmissão do alelo 2 da mutação causal p.M467T e no gene *SLC7A9* estão também evidenciados as duas posições do alelo alternativo correspondentes às alterações “não silenciosas” p.V142M e p.L223M. R - *ratio* de aminoácidos. A codificação utilizada para os haplotipos está descrita nos anexos 7 e 8.

3.4.5. Família E

Nesta família foram estudados para além do caso índice, ambos os progenitores.

A sequenciação do gene *SLC3A1* revelou a presença da mutação previamente descrita na literatura c.1400T>C (p.M467T), em heterozigotia no caso índice (D1/FE) e na mãe (M/FE). Esta é a mutação mais comum no gene *SLC3A1* (Manuel Palacín *et al*, 2001) e já tinha sido identificada no presente estudo na família D.

Quadro 3.13 - Resultados obtidos na família E através da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

Genes	D1/FE ↑↑	P/FE →	M/FE →	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.1400T>C/N	N/N	c.1400T>C/N	<i>Missense</i>
	c.1136+44G>A/N	c.1136+44G>A/N	c.1136+44G>A/N	SNP (não descrita)
<i>SLC7A9</i>	N/N	c.425T>C/N	c.425T>C/N	SNPs “não silenciosos”
	N/N	c.667C>A/N	c.667C>A/N	

Ambos os progenitores são portadores de duas variações já previamente referidas neste trabalho c.425T>C (p.V142A) e c.667C>A (p.L223M) em heterozigotia no gene *SLC7A9*. Contudo o caso índice possui aparentemente dois alelos *wild-type* do gene *SLC7A9* (uma vez que não foi identificado nenhum polimorfismo).

Dado que ambos os progenitores têm uma excreção normal de cistina (R=0.1 e R=0.7), e que a filha exibe uma excreção marcada deste aminoácido (R=26.0) e dos aminoácidos básicos, e que só foi identificado um alelo mutado no gene *SLC3A1*, foi estudado o cDNA, o qual também não revelou alterações. É provável a existência de uma outra mutação neste gene, não detectável pela metodologia utilizada.

3.4.6. Família F

Quadro 3.14 - Resultados da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9* na família F.

Genes	D1/FF ↑↑	D2/FF ↑↑	M/FF →	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.611-2A>C/N	c.611-2A>C/N	c.611-2A>C/N	<i>Splicing</i> (não descrita)
	c.797T>C/N	c.797T>C/N	N/N	SNP “não silencioso”
	c.2019C>G/N	c.2019C>G/N	N/N	<i>Missense</i>
<i>SLC7A9</i>	c.216C>T/N	c.216C>T/N	c.216C>T/N	SNP? (não descrita)

Foram estudados dois irmãos afectados de cistinúria (R>15 - anexo 5) e a mãe de ambos que apresenta excreção normal de cistina (R=0.8).

A sequenciação do gene SLC3A1 revelou que o doente D1/FF e o seu irmão D2/FF são compostos heterozigóticos de duas mutações: 2019C>G (p.C673W) previamente descrita na literatura como causadora de cistinúria e c.611-2A>C uma mutação nova descrita pela primeira vez neste trabalho (3.3.2.1.1.)

Ambos são também portadores da mutação descrita c.797T>C (p.F266S) provavelmente não causal e detectada pela primeira vez num doente que também era homozigoto para uma mutação patogénica no gene *SLC7A9* (Chatzikyriakidou, 2004). Mais tarde (2005) foi feito um estudo populacional para esta mutação na população espanhola tendo sido detectado um positivo em 108 alelos testados, pelo que seguidamente foram feitos a estudos funcionais em oócitos de *Xenopus* tendo-se comprovado que a mutação F266S não modifica significativamente a actividade de transporte quando comparado com o *wild-type*. (Maite Jiménez Vidal, 2005). Recorremos aos programas bioinformáticos *Polyphen* e *SIFT* para fazer uma simulação acerca da sua patogenezidade, que revelou que esta alteração é tolerada pela proteína. Todos os achados levam-nos a supor que esta mutação, tal como as já anteriormente referidas p.V142A e p.L223M, são polimorfismos “não silenciosos”.

No gene SLC7A9 foi encontrada a alteração não descrita na base de dados HGMD (c.216C>T) mas que aparentemente é silenciosa (3.3.2.21.).

3.4.7. Família G

Quadro 3.15 - Resultados obtidos na família G através da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

Genes	D1/FG ↑	P/FG →	M/FG →	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.1136+44G>A/N	c.1136+44G>A/N	c.1136+44G>A/N	SNP (não descrita)
<i>SLC7A9</i>	c.562G>A/N	N/N	c.562G>A/N	Missense
	c.972G>A/N	c.972G>A/N	N/N	SNP “não silencioso”

Todos os membros da família são também portadores para uma alteração no gene SLC3A1, não descrita na literatura c.1136+44G>A e já referida em 3.3.2.1.2.. O genótipo do doente D1/FG para o gene *SLC3A1* é semelhante ao da mãe, sendo improvável que a causa de cistinúria esteja neste gene.

O estudo molecular no gene SLC7A9 revelou a presença da mutação descrita na literatura c.562G>A (p.V188M), em heterozigotia, a qual é resultado da substituição do aminoácido valina por uma metionina no codão 188.

Quanto ao gene *SLC7A9* verifica-se que o doente recebeu o haplotipo da mãe com a mutação p.V188M (c.562G>A) e o haplotipo do pai que possui o polimorfismo c.972G>A (p.A324A) descrito por Chatzikiyakidou *et al*, em 2006 como importante para a expressão fenotípica e comprovado neste trabalho como “não silencioso” ao nível da tradução. Assim a combinação destes dois alelos será a responsável pela cistinúria neste doente.

É de salientar que a excreção de cistina não é muito marcada, (R=2.5), o que permite estabelecer uma relação adequada genótipo/fenótipo.

Dado o acima referido este doente é provavelmente heterozigoto tipo B.

3.4.8. Família H

Tal como no caso de D1/FB não foi possível aceder aos progenitores deste doente, pelo que o estudo se limitou ao caso índice, embora fosse interessante estudar a nível bioquímico o pai e a mãe.

Quadro 3.16 - Resultados obtidos na família H através da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

Genes	D1/FH ↑↑	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.*70A>G/N	SNP (não descrita)
<i>SLC7A9</i>	c.1399+3 delAAGT/N	<i>Splicing</i>
	c.972G>A/N	SNP “não silencioso”

A sequenciação do gene *SLC3A1* não revelou a presença de mutações patogénicas.

No gene *SLC7A9* foi encontrada a mutação c.1399+3delAAGT em heterozigotia, descrita previamente como patogénica em 2001 pelo ICC. Além disso também foi encontrado o polimorfismo c.972G>A (p.A324A) já referido e comprovado neste trabalho como sendo “não silencioso”.

Este doente cistinúrico, terá provavelmente outra mutação que não é detectada pela metodologia utilizada neste trabalho e será provavelmente um doente tipo B (BB) ou AB dada a excreção marcada de cistina.

3.4.9. Família I

Quadro 3.17 - Resultados da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9* na família I.

Genes	D1/FI ↑	D2/FI →	P/FI ↑	M/FI →	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.1136+44G>A/N	c.1136+44G>A/N	c.1136+44G>A/N	c.1136+44G>A/N	SNP (não descrita)
<i>SLC7A9</i>	c.604+1G>A/N	c.604+1G>A/N	c.604+1G>A/N	N/N	<i>Splicing</i>
	c.972G>A/N	N/N	N/N	c.972G>A/N	SNP "não silencioso"

No gene *SLC3A1* o caso índice (D1/FI), e restantes membros da família estudados, (M/FI, P/FI e D2/FI) apresentam a variação intrónica não descrita em heterozigotia c.1136+44G>A (ponto 3.3.2.1.2.). A sua patogenezidade foi testada ao nível do c.DNA e uma vez que se constatou que era uma alteração que não modificava o *splicing* foi tratada como sendo um polimorfismo. É contudo de referir que é uma variação que surge em dois haplótipos distintos, sendo o haplótipo materno mais antigo em relação ao paterno, uma vez que é o que acumula mais variações (figura 3.20).

No gene *SLC7A9* o caso índice apresenta uma mutação de *splicing* do pré-mRNA em heterozigotia, que herdou do pai, a qual se encontra descrita na literatura e é considerada patogénica: c.604+1G>A (ICC, 2001). Esta mutação modifica o local dador de *splicing* GT no intrão 5, o que sugere a ocorrência de *splicing* alternativo neste doente.

O alelo materno, apresenta duas variações em cis c.874-39A>G e c.972G>A (p.A324A) que poderão contribuir para que este doente, apesar de só apresentar uma mutação patogénica, apresente sintomas. Está situação poderá explicar-se pela presença de SNPs modificadores da expressão genética. Segundo Chatzikiyriakidou e colaboradores a presença de dois polimorfismos em *cis* entre si e em *trans* em relação a uma mutação patogénica podem, consoante a sua localização, modificar a expressão da doença, dando-lhe uma expressão de dominância incompleta.

Esta alteração vem revelar que a classificação dos homozigotos e portadores tipo B é por vezes muito complexa e é necessário ter em consideração a haplotipagem e alterações aparentemente silenciosas que depois podem revelar ter algum impacto ao nível do cDNA.

Pela classificação do ICC o doente D1/FI e o pai (P/FI) são heterozigóticos sintomáticos tipo B. A mãe é normal e o irmão é portador tipo B assintomático.

Foi feita a sua haplotipagem para melhor compreensão das alterações encontradas.

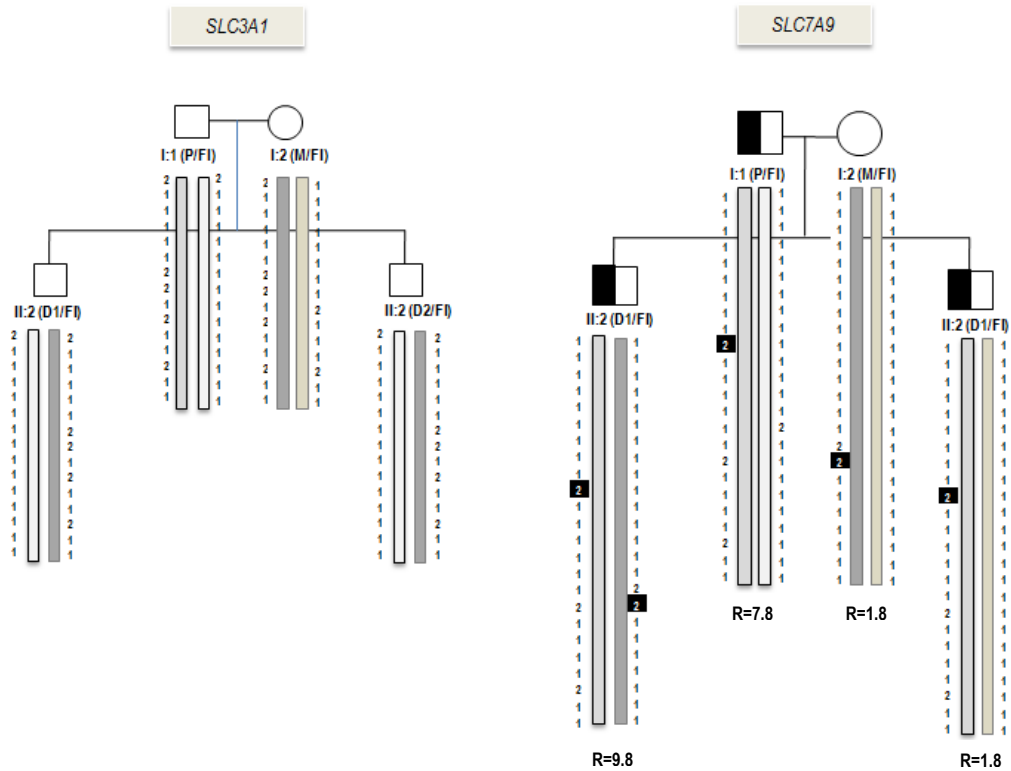


Figura 3.20 - Haplótipos estabelecidos para ambos os genes com base nas alterações de sequência encontradas na família I. No gene *SLC3A1* não há transmissão de genótipos de risco. No gene *SLC7A9* está assinalado, com fundo preto, a transmissão do alelo 2 da mutação causal c.604+1G>A em heterozigotia e da alteração c.972G>A. R - *ratio* de aminoácidos. A codificação utilizada para os haplótipos está descrita nos anexos 7 e 8.

A complexidade na interpretação dos dados encontrados nesta família pode estar relacionada com factores ambientais, nomeadamente a nível paterno.

3.4.10. Família J

Nesta família só foram estudados o caso índice e a mãe.

Quadro 3.18 - Resultados obtidos na família J através da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

Genes	D1/FJ ↑	M/FJ →	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.1136+44G>A/N	c.1136+44G>A/N	SNP (não descrita)
<i>SLC7A9</i>	c.425T>C / c.425T>C	c.425T>C/N	SNPs “ não silenciosos”
	c.667C>A / c.667C>A	c.667C>A/N	

O doente, tem uma excreção moderada de cistina (R=7.7) e a da mãe é normal (R=0.2).

A sequenciação dos dois genes não permitiu identificar nenhuma mutação patogénica.

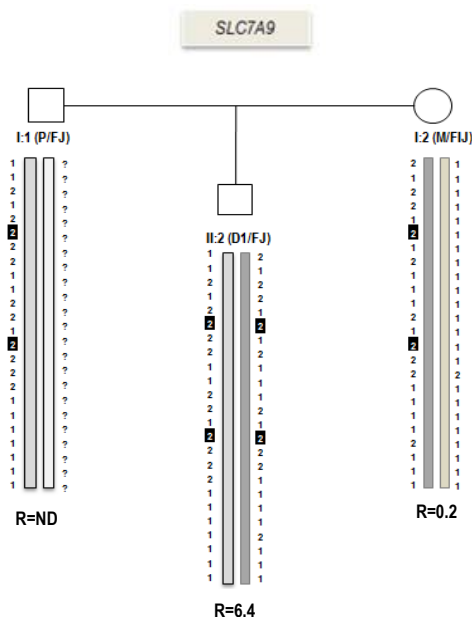


Figura 3.21 – Haplótipos estabelecidos para o gene *SLC7A9* com base nas alterações de sequência encontradas na família J. No gene *SLC7A9* está assinalado, com fundo preto, a transmissão do alelo 2 das alterações “não silenciosas” V142M e L223M. R-ratio de aminoácidos. ND- não disponível. A codificação utilizada para os haplotipos está descrita nos anexos 7 e 8.

3.4.11. Família K

Foram estudados sete membros desta família, dois doentes com cistinúria e cinco familiares.

A sequenciação genómica dos 10 exões e respectivas regiões flanqueadoras do gene *SLC3A1* não revelou a presença de nenhuma mutação patogénica. Foram contudo identificados três SNPs que correspondem a polimorfismos descritos na base de dados *Ensembl genome* (<http://www.ensembl.org/>). Todos os membros da família, com excepção de M2/FK (esposa de D2/FK) são portadores destas alterações em homozigotia excluindo na prática o seu envolvimento na doença. Há contudo que salvaguardar a incapacidade de com a metodologia utilizada identificar grandes deleções que podem estar “camufladas” nesta aparente homozigotia.

Quadro 3.19 - Resultados da sequenciação do gene *SLC7A9* na família K.

Gene	D1/FK ↑↑	D3/FK ↑↑	P/FK ↑	M/FK	D4/FK →	D5/FK →	M2/FK	Tipo de alteração
<i>SLC7A9</i>	c.425T>C / c.425T>C	c.425T>C / c.425T>C	c.425T>C / c.425T>C	c.425T>C / c.425T>C	c.425T>C / c.425T>C	c.425T>C / c.425T>C	c.425T>C /N	SNPs “não silenciosos”
	c.667C>A / c.667C>A	c.667C>A / c.667C>A	c.667C>A / c.667C>A	c.667C>A / c.667C>A	c.667C>A / c.667C>A	c.667C>A / c.667C>A	c.667C>A /N	

Legenda: D4 e D5 são filhas de D2/FK e M2/FK.

No gene *SLC7A9* foram encontradas duas variações de classificação não consensual (c.425T>C ou p.V142A e c.667C>A ou p.L223M), tal como já foi referido na família C. Na família K com excepção de M2/FK, todos apresentaram homozigotia para estas duas variações, embora em termos fenotípicos/bioquímicos consigamos distinguir dois doentes cistinúricos (D1/FK e D3/FK); dois indivíduos com excreção normal de cistina (D4/FK e D5/FK) e um possível portador (P/FK) de cistinúria não-Tipo I, de acordo com os níveis de excreção urinária de cistina. A divergência dos resultados bioquímicos e moleculares levam-nos a considerar a possibilidade da existência de um terceiro gene envolvido no transporte de cistina e aminoácidos básicos de acordo com o sugerido por Leclerc (Daniel Leclerc *et al*, 2001), ou a existência de grandes deleções/ inserções/duplicações, variações intrónicas ou alterações na região promotora.

O estudo molecular desta família deverá prosseguir, de acordo com o sugerido por Bisceglia *et al*, 2009.

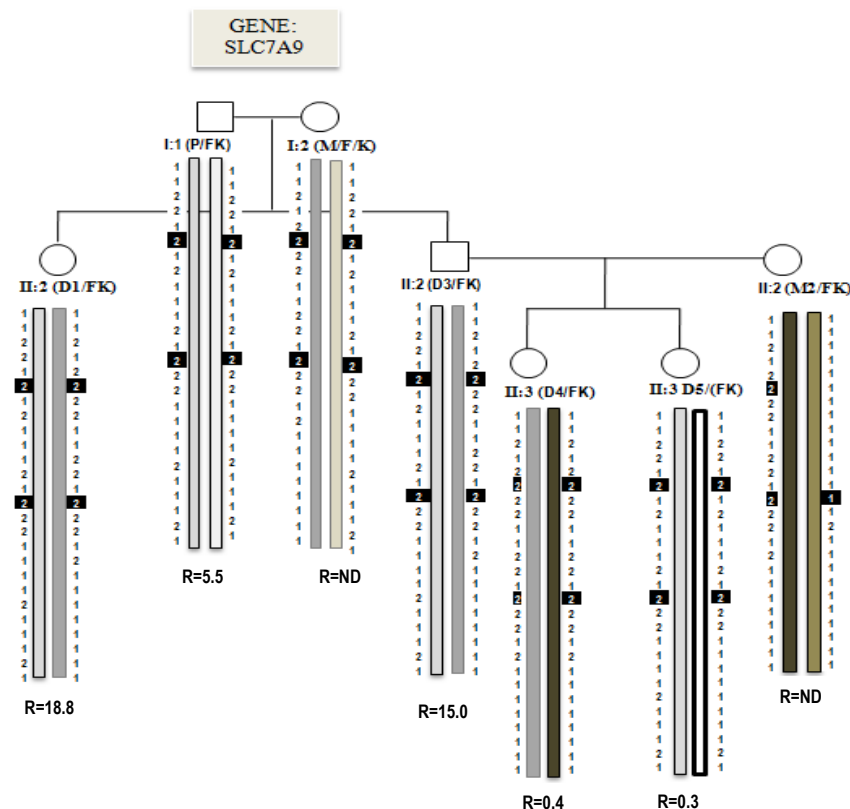


Figura 3.22 - Haplótipos estabelecidos para o gene *SLC7A9* com base nas alterações de sequência encontradas na família K. Está assinalado, com fundo preto, a transmissão do alelo 2 das alterações “não silenciosas” V142M e L223M. onde podemos verificar a transmissão das variações “não silenciosas” V142M e L223M (preto). R-ratio de aminoácidos. ND-não disponível. A codificação utilizada para os haplotipos está descrita nos anexos 7 e 8.

3.4.12. Família L

Quadro 3.20 - Resultados obtidos na família L através da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

Genes	D1/FL ↑	D2/FL ↑	M/FL →	Tipo de alteração
<i>SLC3A1</i>	c.*70A>G/N	c.*70A>G/N	c.*70A>G/N	SNP (não descrita)
<i>SLC7A9</i>	c.1119G>A/N	c.1119G>A/N	c.1119G>A/N	SNP (não descrita)

A sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9* não revelou a presença de mutações causais nesta família. No entanto o caso índice (D1/FL) apresenta valores de excreção de cistina urinária moderadamente elevados (R = 6.1) e a sua irmã (D2/FL), embora com valores inferiores, apresenta valores acima do normal (R = 2.7), o que favorece a classificação de portadores tipo B.

É de salientar que também foram detectadas duas alterações não descritas na literatura em heterozigotia: c.*70A>G (3'UTR) e c.1119G>A (p.S373S) no exão 11. Estas alterações já foram anteriormente referidas, como alterações não causais (3.3.2.1.5. e 3.3.2.2.2.). A primeira porque foi encontrada na população normal e a segunda foi testada a nível do mRNA tendo-se constatado que não altera a proteína. Além disso, a mãe também é portadora e apresenta valores de cistina dentro dos limites normais.

Está em curso o estudo do cDNA do caso índice.

3.5. Classificação bioquímica versus classificação molecular

Nesta secção vamos tentar cruzar os resultados moleculares com as classificações bioquímicas iniciais dos doentes efectuadas em 3.2 (quadro 3.21).

Verifica-se que para os casos índice D1/FA, D1/FC e D1/FF há uma concordância entre a classificação bioquímica efectuada e os resultados do estudo molecular, uma vez que são todos doentes homozigóticos tipo A e a excreção de cistina, quer dos doentes quer dos progenitores disponíveis, encaixam com esta classificação.

Os doentes D1/FD, D1/FE e D1/FH são homozigóticos para a cistinúria em termos bioquímicos, mas não foi possível caracterizar completamente o seu genótipo, uma vez que nestes doentes só foi encontrada uma mutação patogénica. Ou seja neste grupo, os resultados do estudo bioquímico foram mais informativos do que os do estudo molecular. Efectivamente, D1/FD e D1/FE têm uma mutação em *SLC3A1*, e D1/FH em *SLC7A9*, sendo este doente também portador da alteração “não silenciosa” p.A324A.

No caso do doente D1/FB verificamos que a excreção de cistina é moderada e compatível com heterozigotia não tipo I. O estudo molecular revelou uma mutação patogénica em *SLC7A9* concordante com este resultado.

Uma situação distinta observa-se com o doente D1/FG em que a excreção de cistina é moderadamente elevada compatível com heterozigotia não tipo I, mas cujos progenitores têm excreção normal de cistina “orientando erradamente” para uma homozigotia tipo I. O estudo genético revelou uma mutação patogénica em *SLC7A9* e o “polimorfismo” modificador de expressão genética p.A324A, pelo que este doente será um heterozigoto tipo B, o que está em concordância com a sua excreção urinária de cistina.

O caso D1/FI aproxima-se do doente D1/FG e é compatível com heterozigotia. O estudo dos progenitores sugere um tipo misto (pai excretor e mãe normal). O estudo molecular é idêntico ao do D1/FG revelando heterozigotia no gene *SLC7A9* e a presença do “polimorfismo” p.A324A. Há a referir a influência de factores extrínsecos, nomeadamente ambientais (ou outros) nesta família, que poderão contribuir para o fenótipo do pai.

Os doentes D1/FJ e D1/FL foram classificados em função da excreção de cistina como heterozigotos não tipo I e o doente D1/FK como homozigoto. Nestes três casos só foi possível estudar um dos progenitores pelo que não foi possível classificá-los em função da excreção de cistina pelos pais. No estudo molecular não foi identificada nenhuma mutação patogénica, pelo que não nos foi possível estabelecer uma relação com as alterações bioquímicas encontradas.

Em função de tudo o que foi referido parece-nos que a análise bioquímica se mantém essencial em termos de diagnóstico e que a classificação com base nos parâmetros bioquímicos é mais informativa sobre o risco de nefrolitíase do que a molecular. No entanto a conjugação das duas constitui uma abordagem mais completa desta patologia genética, permite progredir no sentido de um melhor conhecimento da variabilidade associada o qual poderá futuramente trazer vantagens em termos de abordagem terapêutica.

Quadro 3.21 – Classificação bioquímica *versus* classificação molecular.

Casos index e familiares	Litíase	Ratíio de Cys	Classificação bioquímica				Classificação genética								
			pele fenótipo dos doentes	e excreção de Cys dos progenitores				Tipo A	Tipo B	Tipo AB	Indefinido	SLC3A1		SLC7A9	
				Tipo I	Tipo não-I	Tipo misto	Tipo indefinido					Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
D1/FA	?	12,4	Homozigoto					X				c.647C>T	c.1190A>G		
D1/FB	Não	4,1	Heterozigoto não tipo I						X					c.614_615insA	
D1/FC	Sim	25,6	Homozigoto					X				c.1597T>A	c.1597T>A	c.425T>C	c.667C>A
D1/FD	Sim	14,5	Homozigoto	X				X				c.1400T>C		c.425T>C	c.667C>A
D1/FE	Não	26,0	Homozigoto	X				X				c.1400T>C		c.425T>C	c.667C>A
D1/FF	Sim	18,6	Homozigoto				X			X		c.611-2A>C	c.2019C>G		
D1/FG	Não	2,5	Heterozigoto não tipo I	X				X						c.562G>A	c.972G>A
D1/FH	Não	22,4	Homozigoto							X				c.1399+3delAAGT	c.972G>A
D1/FI	Sim	9,8	Heterozigoto não tipo I			X			X					c.604+1G>A	c.972G>A
D1/FJ	?	7,7	Heterozigoto não tipo I				X			X				c.425T>C	c.667C>A
D1/FK	Sim	18,8	Homozigoto				X			X				c.425T>C	c.667C>A
D1/FL	?	6,1	Heterozigoto não tipo I				X			X					
Outros familiares															
D3/FC		0,6	Normal					X				c.1597T>A		c.425T>C	c.667C>A
D2/FD		14,0	Homozigoto	X						X		c.1400T>C		c.425T>C	c.667C>A
D2/FF		15,8	Homozigoto	X				X				c.611-2A>C	c.2019C>G		
D2/FI		1,8	Normal						X					c.604+1G>A	
D3/FK		15,0	Homozigoto		X?					X				c.425T>C	c.667C>A
D4/FK		0,4	Normal							X				c.425T>C	c.667C>A
D5/FK		0,3	Normal							X				c.425T>C	c.667C>A
D2/FL		2,7	Heterozigoto não tipo I		X?					X					
Progenitores															
M/FA		ND	ND										c.1190A>G		c.667C>A
P/FD		0,7	Normal							X					
M/FD		0,4	Normal							X		c.1400T>C		c.425T>C	
P/FE		0,1	Normal							X				c.425T>C	c.667C>A
M/FE		0,7	Normal							X		c.1400T>C		c.425T>C	c.667C>A
M/FF		0,8	Normal							X		c.611-2A>C			
P/FG		0,3	Normal							X					c.972G>A
M/FG		0,6	Normal							X				c.562G>A	
P/FI		7,8	Heterozigoto não tipo I						X					c.604+1G>A	
M/FI		1,8	Normal							X					c.972G>A
M/FJ		0,2	Normal							X				c.425T>C	c.667C>A
P/FK		5,5	Heterozigoto não tipo I							X				c.425T>C	c.667C>A
M/FK		?	?							X				c.425T>C	c.667C>A
M/FL		0,4	Normal												

Legenda: As mutações causais estão descritas a preto; as alterações não silenciosas estão a azul e a laranja. As linhas azuis referem as classificações em heterozigotia, as linhas rosa referem as que estão em homozigotia e as cinza referem os casos inconclusivos. D1-casos index; F-família; A a L-codificação utilizada para identificar as famílias; D2 a D5-identificação de outros familiares estudados; P-pai; M-mãe; ND-não disponível.

IV - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

IV - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Passaram-se mais de 100 anos desde que a estrutura química da cistina foi desvendada por Friedman e cerca de dois séculos desde que este aminoácido foi identificado pela primeira vez como constituinte de cálculos renais (Ahmed, *et al* 2006) mas apesar disso permanece um tema actual de investigação em saúde.

A cistinúria é uma doença rara caracterizada por uma diminuição na reabsorção renal dos aminoácidos cistina, ornitina, lisina e arginina, devido a uma deficiência numa das duas subunidades que formam a molécula do seu transportador localizado no túbulo contornado proximal. A alteração do transportador implica um aumento da concentração urinária dos quatro aminoácidos referidos, contudo somente o aumento da concentração de cistina na urina leva à formação de cálculos devido à sua baixa solubilidade a pH urinário normal.

O modo de transmissão autossómico recessivo desta patologia urológica foi pela primeira vez descrito em 1955. Contudo sabemos hoje que o seu padrão de hereditariedade é bastante mais complexo, havendo pelo menos dois genes envolvidos e formas de transmissão que têm vindo a ser consideradas autossómicas recessivas e outras como autossómicas dominantes de penetrância incompleta (Palacin *et al*, 2001).

Este trabalho tem duas vertentes principais:

- i. Classificação dos doentes portugueses com cistinúria com base em aspectos bioquímicos.
- ii. Estudo molecular dos doentes e seus familiares seguido da sua classificação genética.

A classificação dos doentes em termos bioquímicos é simples.

Tal como se referiu anteriormente, o estudo do perfil dos aminoácidos urinários constitui uma primeira abordagem para o diagnóstico e posterior classificação dos doentes com cistinúria. Há pelo menos três formas distintas de abordar os parâmetros bioquímicos para estratificar os doentes. Neste trabalho utilizamos um parâmetro adicional “*ratio* entre a concentração de cistina excretada e a média da concentração da cistina na população de referência” para efectuar essa divisão e estabelecemos valores que nos permitem dividir a população em três grupos: normal (que incluem heterozigotos tipo I), heterozigotos não tipo I e homozigotos, independentemente dos valores de referência e da metodologia utilizada. Esta abordagem revelou-se concordante com as

previamente publicadas e pode ser utilizada na classificação bioquímica dos indivíduos suspeitos de cistinúria que tenham, ou não, urolitíase.

A classificação molecular da cistinúria iniciou-se com a clonagem do gene *SLC3A1* em 1994 e só em 1999 é que foi identificado pelo Consórcio Internacional de Cistinúria o segundo gene envolvido nesta patologia (*SLC7A9*).

A partir dessa data foram publicados vários estudos referentes a diversas populações. Com este trabalho pretendemos iniciar a caracterização dos doentes portugueses com cistinúria recorrendo à sequenciação das regiões codificantes dos dois genes em causa. Assim, foi feito o levantamento de famílias seguidas no Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães e no Hospital Maria Pia, as quais foram orientadas pelos respectivos clínicos para a consulta de genética.

Foram detectadas 15 alterações na sequência do gene *SLC3A1*, cinco das quais novas, sendo três patogénicas c.611-2A>C (mutação de *splicing*), c.1190A>C (ou p.Y397C) e c.15997>A (ou p.Y533N) ambas mutações *missense*; e duas variações consideradas não patogénicas c.*70A>G e c.1136+44G>A. No gene *SLC7A9* foram encontradas 24 alterações de sequência, três das quais não tinham previamente sido descritas na literatura: duas correspondem a substituições por codões homólogos c.216>T (ou p.C72C) e c.1119G>A (ou p.S373S), e uma localizada na extremidade 3'-UTR (c*82C>T).

O gene onde foram detectadas mais mutações foi o *SLC3A1*, o que está de acordo com o descrito na literatura. Efectivamente dos casos em estudo, a cistinúria tipo A ou tipo I, foi a mais frequente, tendo sido detectados cinco doentes com alterações no gene *SLC3A1* (tipo A), sendo que dois são heterozigotos, um é homozigoto e dois são heterozigotos compostos, enquanto que foram apenas detectados quatro doentes com alterações no gene *SLC7A9* (tipo B), todos heterozigotos.

Com este estudo ficaram caracterizados completamente seis dos doze doentes: um homozigoto e dois heterozigotos compostos para mutações em *SLC3A1* e três heterozigotos para *SLC7A9*.

Em três doentes não foram detectadas mutações causais de cistinúria e 3 doentes permanecem com resultado molecular inconclusivo, uma vez que não foi possível, com base nos estudos clínicos e bioquímicos, estabelecer uma correcta correlação genótipo/fenótipo.

É de salientar que não detectamos nenhum caso de cistinúria digénica (tipo AB).

Noutros estudos realizados anteriormente, a detecção e caracterização molecular da cistinúria nunca foi de 100%, ficando sempre doentes para estudo com classificação de “inconclusivos” (Z. Skopková *et al*; 2005).

A cistinúria é uma patologia tratável; a análise molecular estabelecida proporciona a confirmação do diagnóstico clínico e bioquímico e permite o aconselhamento genético. Estes conhecimentos são úteis ao clínico que tem de fazer o acompanhamento e tratamento destes doentes. Contudo, a complexidade dos resultados obtidos e o facto de permanecerem doentes por caracterizar leva-nos a deduzir que a análise molecular deve prosseguir com diferentes abordagens metodológicas.

A continuação do estudo das bases moleculares da cistinúria na população portuguesa, proporcionará conhecimento científico que contribuirá para o entendimento da relação genótipo/fenótipo de uma das doenças dos transportadores de aminoácidos mais frequentes, no entanto a pequena dimensão da série em estudo e a heterogeneidade dos resultados não nos permite de momento avançar com segurança com generalizações.

Este trabalho permitiu ainda verificar que em alguns casos a presença de determinados SNPs como se demonstrou com p.A324A, podem desempenhar um papel importante na expressão da patologia, pelo que devem ser estudados não só em termos populacionais mas também, sempre que possível, deve ser feita uma abordagem a nível do cDNA de modo a poder identificar o efeito destes supostos SNPs ao nível da proteína.

Perspectivas futuras

A realização deste trabalho não encerrou a presente linha de estudo e é apenas o primeiro passo para a caracterização molecular dos doentes cistinúricos.

Assim, como reptos de investigação futura, seria interessante:

- Complementar a avaliação do impacto das mutações encontradas ao nível da proteína, através de modelizações da estrutura tridimensional.

- Realizar estudos de quantificação dos níveis de mRNA por *Real Time* PCR e avaliar o impacto das mutações encontradas a nível da proteína através de técnicas de *imunoblot*.

- Identificar as mutações presentes nos alelos dos doentes não classificados e dos doentes cujo resultado molecular não está em concordância com o fenótipo clínico e bioquímico, através da pesquisa de grandes deleções e inserções através da técnica de MLPA e do estudo das zonas promotoras dos genes.

- Efectuar estudos de expressão para determinar o impacto das novas mutações na actividade transportadora da proteína.

- Investigar alguns dos SNPs ao nível do cDNA, a nível populacional e se possível em modelos biológicos pois é possível que alguns, tal como a alteração p.A324A, estejam a ser desvalorizados em termos de impacto para a patologia e possam explicar os casos de aparente transmissão “autossómica dominante”.

- Alargar o grupo de doentes em estudo de modo a obter uma visão mais abrangente da realidade portuguesa.

V – BIBLIOGRAFIA

V - BIBLIOGRAFIA

Acar B., Arian F. I., Emeksiz S., Dallar Y. Risk factors for nephrolithiasis in children. World J Urol. 2008; 26:627-630.

Ahmed K., Dasgupta P., Khan M. S. Cystine calculi: challenging group of stones. Postgrad. Med. J. 2006; 82:799-801.

Amâncio F.A.M., Scalco F.B. Investigação diagnóstica de erros inatos do metabolismo em um hospital universitário. J. Bras. Patol. Med. Lab. C.A.R. 2007; 43(3):169-174.

Araújo A.P.Q.C. Doenças metabólicas com manifestações psiquiátricas. Ver. Psiqu. Clin. 2004; 31:285-289.

Ascenso C., Quintas A. Estrutura e propriedades dos aminoácidos e péptidos. In: Quintas A., Freire A. P., Halpern M. J. *Bioquímica Organização Molecular da Vida*. Lidel editors, Lisboa, 2008; 10:141-159.

Aydogdu S. D., Kirel B., Coskun T., Kose S. Prevalence of cystinuria among elementary schoolchildren in Eskisehir, Turkey. Scandinavian Journal of Urology and Nephrology. 2009; 43:138-141.

Bartoccioni P., Rius M., Zorzano A., Palacín M. Chillarón J. Distinct classes of trafficking rBAT mutants cause the type I cystinuria phenotype. Human Molecular Genetics. 2008; Vol 17, N° 12: 1845-1854.

Bisceglia L., Fischetti L., Bonis PD., Palumbo O., Augello B., Stanziale P., Carella M., Zelante L. Large rearrangements detected by MLPA, point mutations, and survey of the frequency of mutations within the SLC3A1 and SLC7A9 genes in a cohort of 172 cystinuric Italian patients. Mol Genet Metab. 2009; Sep 6.

Bisceglia L., Calonge M. J., Totaro A., Feliubadaló L., Melchionda S., García J., Testar X., Gallucci M., Ponzzone A., Zelante L., Zorzano A., Estivil X., Gasparini P., Nunes V., Palacín M. Localization, by Linkage Analysis, of Cystinuria Type III Gene to Chromosome 19q13.1. Am.J.Genet. 1997; 60:61-616.

Bisceglia L., Purroy J., Jiménez-Vidal M., D'Amano A. P., Rousaud F., Beccia E., Penza R., Rizzoni G., Gallucci M., Palacín M., Gasparini P., Nunes V., Zelante L. Cystinuria type I: Identification of eight new mutations in SLC3A1. Kidney International. 2001; vol. 59.1250-1256.

Biyani C. S., Cartledge J. Cystinuria-Diagnosis and Management. European Association of Urology. 2006; 175-183.

Botzenhart E., Vester U., Schmidt C., Hesse A., Halber M., Wagner C., Lang F., Hoyer P., Zerres K., Eggermann T., members of the Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische nephrology (APN).

Cystinuria in children: Distribution and frequencies of mutations in the SLC3A1 and SLC7A9 genes. *Kidney International.* 2002; Vol. 62:1136-1142.

Broer A., Cavanaugh J. A., Rasko J. E. J., Broer S. The molecular basis of neutral aminoacidurias. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* 2006; 451:511-517.

Bröer S. Apical Transporters for Neutral Amino Acids: Physiology and Pathophysiology. *Physiology.* 2008; 23:95-103.

Calonge M. J., Volpini V., Bisceglia L., Rousaud F., Sanctis L., Beccia E., Zelante L., Zorzano A., Estivill X., Gasparini P., Nunes V., Palacín M. Genetic heterogeneity in cystinuria: the SLC3A1 gene is linked to type I but not to type III Cystinuria. *Genetics.* 1995; 92:9667-9671.

Chabrol B., Martens K., Meulemans S., Cano A., Jaeken J., Matthijs G., Creemers J.W.M. Deletion of C2orf34, PREPL and SLC3A1 causes atypical cystinuria syndrome. *J. Med. Genet.* 2008; 45:314-318.

Chatzikiyakidou A., Louizou E., Dedousis G.V.Z., Bisceglia L., Michelakakis H., Georgiou I. An overview of SLC3A1 and SLC7A9 mutations in Greek cystinuria patients. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2008; 95:192-193.

Chairoungdua A., Kanai Y., Matsuo H., Inatomi J., Kim DK., Endou H. Identification and characterization of a novel member of the heterodimeric amino acid transporter family presumed to be associated with an unknown heavy chain. *J Biol Chem.* 2001; 28:276; 28:276(52):49390-9.

Chatzikiyakidou A., Sofikitis N., Georgiou I. Identification of novel cystinuria mutations and polymorphisms in SLC3A1 and SLC7A9 genes: absence of SLC7A9 gene mutation in cystinuric patients. *Genet Test.* 2005; 9(3):175-84.

Chatzikiyakidou A., Sofikitis N., Kalfakakou V., Siamopoulos K., Georgiou L. Evidence for association of SLC7A9 gene haplotypes with cystinuria manifestation in SLC7A9 mutation carriers. *Urol Res.* 2006; 34:299-303.

Coe F. L., Evan A., Worcester E. Kidney stone disease. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:2598-2608.

Dello Strologo L., Bras E., Pontesilli C., Beccia E., Ricci-Barbini V., Sanctis L., Ponzzone A., Galluci M., Bisceglia L., Zelante L., Jimenez-Vidal M., Font M., Zorzano A., Rousaud F., Nunes V., Gasparini P., Palacín M., Rizzoni G. Comparison between SLC3A1 and SLC7A9 Cystinuria Patients and Carriers: a Need for a New Classification. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13:2547-2553.

Den Dunnen J.T., Antonarakis E. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 2001;109:121-124.

Evan A.P., Coe F.L., Lingeman J.E., Shao Y., Matlaga B.R., Kim S.C., Bledsoe S.B., Sommer A.J., Grynopas M., Phillips C.L., Worcester E.M. Renal Crystal deposits and histopathology in patients with cystine stones. *Kidney International.* 2006; 00:1-9.

- Feliubadaló L., Arbonés M.L., Mañas S., Chillarón J., Visa J., Rodés M., Rousaud F., Zorzano A., Palacín M., Nunes V. **Slc7a9-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis.** Hum Mol Genet. 2003; Sep 1;12; 12(17): 2097-108.
- Feliubadaló L., Bisceglia L., Font M., Dello Strologo L., Beccia E., mine Arslan-kirchner, beat Steinmann, Zelante L., Estivill X., Zorzano A., Palacín M., Gasparini P., Nunes V. **Recombinant Families Locate the Gene for Non-Type I Cystinuria between Markers C13 and D19S587 on Chromosome 19q13.1.** Genomics. 1999; 60:362-365.
- Fernández L. M. R., Armentia S., Lapeña L. **Cistinuria. Revisión teórica.** Boletín de la Sociedade de Pediatria de Asturias, Cantabria, Castilla Y Leon. 1997; 37:73-77.
- Finer G., Shalev H., Landau D. **Genetic Kidney diseases in the pediatric population of southern Israel.** Pediatr Nephrol. 2006; 21:910-916.
- Font-Llitjós M., Feliubadaló L., Espino M., Clèries R., Mañas S., Frey I.M., Puertas S., Colell G., Palomo S., Aranda J., Visa J., Palacín M., Nunes V. **Slc7a9 knockout mouse is a good cystinuria model for antilithiasic pharmacological studies.** Am J Physiol Renal Physiol. 2007; 293 (3), F732-40.
- Font-Llitjós M., Jiménez-Vidal M., Di Perna M., Sanctis L., Rousaud F., Zelante L., Palacín M., Nunes V. **New insights into cystinuria: 40 new mutations, genotype-phenotype correlation, and digenic inheritance causing partial phenotype.** J Med Genet. 2005; 42:58-68.
- Francés F., Portolés O., Corella D., Sorlí J. V., Sabater A., Carrasco P., Guillén M. **Variaciones en el gen SLC7A9: impacto de trece mutaciones frecuentes en la etiología de la cistinuria en población mediterránea española.** Med Cli (Barc). 2006; 127(5):161-6.
- Guillén M., Corella D., Cabello M. L., García A. M., Hernández-Yago J. **Reference Values of Urinary Excretion of Cystine and Dibasic Aminoacids: Classification of Patients with Cystinuria in the Valencian Community, Spain.** Clinical Biochemistry. 1999; 32(1):25-30.
- Horn F. **Aminoácidos.** In Donald Voet et Judith G. Voet, *Bioquímica*. 3ª edição, Porto Alegre. Artmed editors. 2006; 4:65-79.
- Husny A.S.E., Fernandes-Caldato, M.C. **Erros inatos do Metabolismo: revisão da literatura.** Revista Paraense de Medicina. 2006; 20:41-45.
- International Cystinuria Consortium:** Group A: Font M., Feliubadaló L., Estivill X., Nunes V.; Group B: Golomb E., Kreiss Y., Pras E.; Group C: Bisceglia L., Adamo P., Zelante L., Gasparini P.; Group D: Bassi M. T., George Jr A. L., Manzoni M., Riboni M., Ballabio A., Borsani G.; Group E: Reig N., Fernández E., Zorzano A., Bertran J., Palacín M. **Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria.** Human Molecular Genetics. 2001; 10(4):305-316.

Iraola G. A., Langman C. B. Cistinuria. *In:* Pablo Sanjurjo, Antonio Baldellou, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias, 2ª edición, P. Sanjurjo Crespo y A. Baldellou Vásquez, Edita: Ergon, Madrid. 60:737-741.

Jaeken J., Martens K., François I., Eyskens F., Lecointre C., Derua R., Meulemans S., Slootstra J. W., Waelkens E., Zegher F., Creemers J. W.M., Matthijs G. Deletions of *PREPL*, a Gene Encoding a Putative Serine Oligopeptidase in Patients with Hypotonia-Cystinuria Syndrome. *The Am. J. Hum. Genetics.* 2006; 78:38-51.

Jungers P., Joly D., Blanchard A., Courbebaisse M., Knebelmann B., Daudon M. Inherited monogenic Kidney stone diseases: Recent diagnostic and therapeutic advances. *Néphrologie Thérapeutique.* 2008; 4:231-255.

Knoll T., Zöllner A. Z., Wendt-Nordahl G., Stephan M. M., Alken P. Cistinuria in childhood and adolescence: recommendation for diagnosis, treatment, and follow-up. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20:19-24.

Lecrec D., Wu Q., Ellis J. R., Goodyer P., Rozen R. Is the *SLC7A10* Gene on Chromosome 19 a Candidate Locus for Cystinuria?. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2001; 73:333-339.

Martens K., Jaeken J., Matthijs G., Creemers J. W. M. Multi-System Disorder Syndromes Associated with Cystinuria Type I. *Current Molecular Medicine.* 2008.

Nakagawa Y., Coe F.L. A modified cyanide-nitroprusside method for quantifying urinary cystine concentration that corrects for creatinine interference. *Clinica Chimica Acta.* 1999; 289:57-68.

Ogino S., Gulley M. L., T. den Dunnen J. T., Wilson R. B., and the Association for Molecular Pathology Training and Education Ccommittee. Standard Mutation Nomenclature in Molecular Diagnosis. *Journal of Molecular Diagnosis.* 2007; vol 9.

Palacín M., Borsani G., Sebastio G. The molecular bases of cystinuria and lysinuria protein intolerance. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2001; 11:328-335.

Palacín M., Goodyer P., Nunes V., Gasparini P. Cystinuria. *In:* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds; Child B, Kinzler KW, Vogelstein B, assoc. eds. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**, 8th editionn. New York, NY: McGraw-Hill, 2001; 191:4909-4932.

Palacín M., Nunes V., Font-Llitjós M., Jiménez-Vidal M., Fort J., Gasol E., Pineda M., Feliubadaló L., Chillarón J., Zorzano A. The Genetics of Heteromeric Amino Acid Transporters. *Physiology.* 2005, 20:112-124.

Parvari R., Brodyansky I., Elpeleg O., Moses S., Landan D., HersHKovitz E. A Recessive Contiguous Gene Dletion of Chromosome 2p16 Associated with Cystinuria and a Mitochondrial Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 20015; 69:869-875.

- Parvex P., Rozen R., Dziarmaga A., Goodyer P. Studies of urinary cystine precipitation in vitro: ontogeny of cystine nephrolithiasis and identification of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid as a potential therapy for cystinuria.** *Molecular Genetics and Metabolism.* 2003; 80:419-425.
- Peres L., Largura A. Cystinuria-transitory recovery: is it possible?.** *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2008.
- Pras E., Pras E., Kreiss Y., Frishberg Y., Prosen L., Aksentijevich I., Kastner D. L. Refined Mapping of the CSNU3 Gene to a 1.8-Mb Region on Chromosome 19q13.1 Using Historical Recombinants in Libyan Jewish Cystinuria Patients.** *Genomics.* 1999; 60:248-250.
- Raciti D., Reggiani L., Geffers L., Jiang Q., Bacchion F., Subrizi A. E., Clements D., Tindal C., Davidson D. R., Kaissling B., Brandli A. W. Organization of the pronephric kidney revealed by large-scale gene expression mapping.** *Genome Biology.* 2008; 9:R84.
- Raghuveer T.S., Garg U., Graf W.D. Inborn Errors of Metabolism in infancy and early childhood: an update.** *American Family Physician.* 2006; 73:1981-1990.
- Rule A. D., Bergstralh E. J., Melton III L. J., Xujian L., Weaver A. L., Lieske J. C. Kidney Stones and the Risk for Chronic Kidney Disease.** *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4:804-811.
- Saudubray F., Saudubray J.M., Berghe G. V. D. Transport Defects of Amino Acids at the Cell Membrane: Cystinuria, Lysinuria Protein Intolerance and Hartnup Disorder.** *In: Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment.* John H. Walter editors, 4^a Revised Edition. 2006;26:323-325.
- Shigeta Y., Kanai Y., Chairoungdua A., Ahmed N., Sakamoto S., Matsuo H., et al. A novel missense mutation of SLC7A9 frequent in Japanese cystinuria cases affecting the C-terminus of the transporter.** *Kidney Int.* 2006; 69:1198-1206.
- Schmidt C., Vester U., Hesse A. The population-specific distribution and frequencies of genomic variants in the SLC3A1 and SLC7A9 genes and their application in molecular genetic testing of cystinuria.** *Urol res.* 2004; 32:75-8.
- Scriver C. R. Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter "Inborn Errors of Metabolism": Albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008.** *J Inherit Metab Dis.* 2008; 31:580-598.
- Skopková Z., Hrabincová E., Státná S., Kozák L., Adam T. Molecular genetic analysis of SLC3A1 and SLC7A9 genes in Czech and Slovak cystinuric patients.** *Ann Hum Genet.* 2005; Sep;69:501-7.
- Stansfield W. D., Colomé J. S., Cano R. J. Biomacromoléculas.** *In Biología Molecular e Celular.* McGraw-Hill editors, Amadora. 1998; 2:41-44.

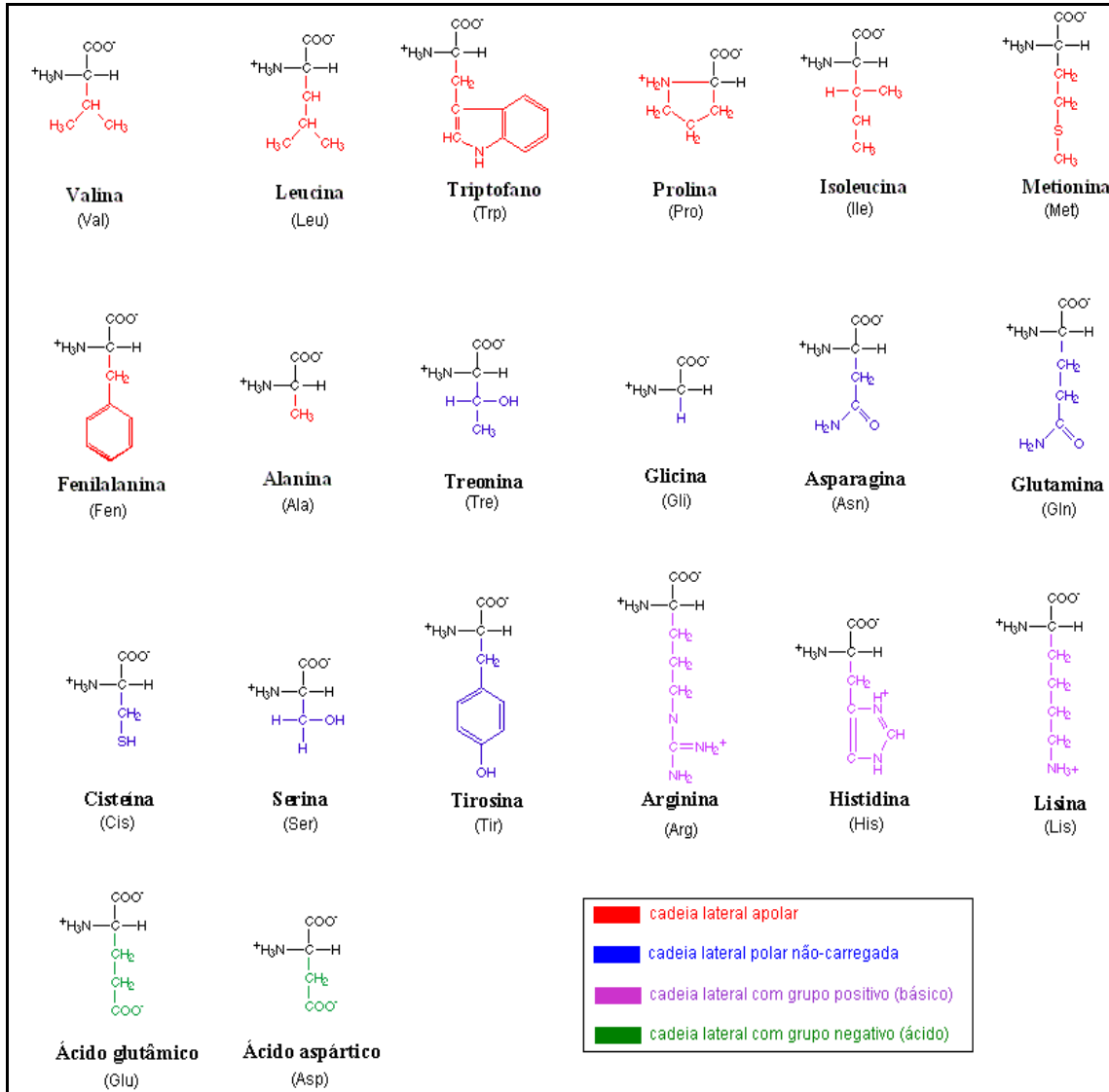
Termignoni C. Introdução ao Metabolismo. In: Donald Voet et Judith G. Voet, *Bioquímica*, 3ª *Bioquímica*, 3ª edição, Porto Alegre. Artmed editors. 2006; 16:549-580.

Yuen Y-P., Lam C-W., Lai C-K., Tong S-F., Li P-S., Tam S., Kwan Ey-W., Chan S-Y., Tsang W-K., Chan K-Y., Mak W-L., Cheng C-W., Chan Y-W. Heterogeneous mutations in the *SLC3A1* and *SLC7A9* genes in chinese patients with cystinuria. *Kidney International*. 2006; 69:123-128.

VI –ANEXOS

ANEXO - 1

Quadro A1 - Os 20 aminoácidos que entram na composição das proteínas e respectiva classificação em função da natureza química das cadeias laterais.



ANEXO - 2

Doenças, envolvendo proteínas de transporte

No Quadro A2, estão descritas diversas doenças, envolvendo proteínas de transporte, que são transmitidas como traços mendelianos e que, levam a alterações clinicamente relevantes na função renal e na homeostase de fluidos e eletrólitos.

Quadro A2 - Doenças renais monogénicas envolvendo proteínas de transporte.

Doenças		Transmissão	Gene	Proteína de transporte	Localização	Fenótipo
Cistinúria	Tipo I	AR	<i>SLC3A1</i>	Transportador de aminoácidos básicos (rBAT)	Túbulo proximal	Aumento de excreção de aminoácidos básicos, nefrolitíase (cálculos renais)
	Tipo II/III	ARI	<i>SLC7A9</i>	b ⁰ +AT	Túbulo proximal	
Acidose tubular renal proximal		AR	<i>SLC4A4</i>	Co-transportador Na ⁺ -HCO ₃ ⁻	Túbulo proximal	Acidose metabólica hiperclorêmica
Síndrome Bartter		AR	<i>SLC12A1</i> (tipol)	Transportador Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ (sensível à furosemida)	Segmento ascendente espesso (SEA)	Hipocalemia, alcalose metabólica, heparaldosteronismo
			<i>KCNJ1</i> (tipoll)	Canal de potássio		
			<i>CLCNKB</i> (tipolll)	Canal de cloreto		
Nefrolitíase ligada ao cromossoma X (doença de Dent)		XLR	<i>CLC5</i>	Canal de cloreto (ClC-5)	Túbulo distal	Hipercaleiúria, nefrolitíase (cálculo renais)
Síndrome e hipomagnesemia e hipercaleiúria		AR	<i>PCCLN-1</i>	Paracelina-1	Segmento ascendente espesso (SEA)	Hipomagnesemia hipercaleiúria, nefrolitíase
Síndrome de Gitelman		AR	<i>SLS12A3</i>	Co-transformador sensível a tiazídicos	Túbulo distal	Hipomagnesemia, alcalose metabólica, hipocalêmica, hipocalciúria, hipotensão.
Pseudo-hipoaldosteronismo, tipo 1 ^a		AR	<i>SCNN1A, SCNN1B e SCNN1G</i>	Subunidades α , β , γ do canal para sódio sensível à amiloride	Ducto cloreto	Aumento na excreção de Na ⁺ , hipertensão
Síndrome de Liddle		AD	<i>SCNN1B, SCNN1G</i>	Subunidades α , β , γ do canal para sódio sensível à amiloride	Ducto cloreto	Diminuição na excreção de Na ⁺ , hipertensão
Diabetes insípida nefrogénico		AR	<i>AQP2</i>	Canal para água aquaporina 2	Ducto cloreto	Poliúria, polidipsia, hiperosmolaridade plástica
Acidose tubular renal distal		AD	<i>SLC4A1</i>	Permutador Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	Ducto cloreto	Acidose metabólica, hipocalemia, hipercaleiúria, nefrolitíase (cálculos renais)
		AR	<i>ATP6B1</i>	Subunidade da H ⁺ -ATPase		
		AR	<i>ATP6N1A</i>	Subunidade acessória da H ⁺ -ATPase		

Legenda: AD- autossómica dominante AR- autossómica recessiva; ARI, autossómica recessiva incompleta; XLR, recessiva ligada ao cromossoma X; b⁰, +AT, subunidade leve de *rTAB* (Modificado a partir de Guay-Woodford LM: Overview: the genetics of renal disease, *Semin Nephrol* 19 (4): 312, 1999 e Zelkovic I: Molecular pathophysiology of tubular transport disorders, *Pediatr Nephrol* 16:919, 2001)

ANEXO - 3

Litíases renais hereditárias

Embora as litíases renais hereditárias monogénicas representem apenas uma pequena fracção das litíases, tem havido ao longo dos últimos anos um progresso considerável no conhecimento da sua etiologia, graças aos avanços da genética molecular.

As litíases genéticas revelam os seguintes mecanismos principais:

- Um EIM, em que a anomalia enzimática leva à hiperprodução endógena de um metabolito, o que conduz ao aumento da sua excreção urinária. Estes metabolitos em excesso, são responsáveis pela formação de cálculos e infiltram-se no parênquima renal formando cristais específicos (oxalato de cálcio; ácido úrico; 2,8-dihidroxiadenina, xantina), responsáveis pela destruição progressiva dos nefrónios. Esta situação cria um ciclo vicioso que conduz à insuficiência renal.

- As tubulopatias congénitas, caracterizadas por uma alteração dos sistemas de transporte do cálcio, do fósforo e do magnésio. Estas doenças são responsáveis por litíase e pela nefrocalcinose. A maioria envolve danos celulares do epitélio tubular e consequentemente fibrose túbulo-intersticial extensiva conduzindo à insuficiência renal.

- Uma anomalia isolada do transporte trans-epitelial da cistina e dos aminoácidos básicos, sendo esta a causa da cistinúria, cuja tradução clínica é caracterizada pela formação de cálculos.

Quadro A3 - Doenças renais monogénicas envolvendo proteínas de transporte.

Erros inatos do metabolismo	
<i>Do oxalato</i>	Hiperoxalúria primária tipo 1 Hiperoxalúria primária tipo 2
<i>Das purinas</i>	Síndrome de Lesch-Nyhan Hiperactividade da PRPP sintetase Défice em ART(dihidroxiadeninúria) Défice em xantina oxidase (xantínúria)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ácido úrico ▪ 2,8-DHA 	
Xantina	
<i>Das primidinas</i>	Défice em UMP sintetase (orotúria)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ácido orótico 	
Tubulopatias congénitas <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tubulo proximal ▪ Doença de Dent e síndrome de Lowe (óculo-cerebro-renal)^(a) ▪ Raquitismo hipofosfatémicos hereditários ^(a) ▪ Hipo-uricémia idiopática familiar ▪ Cistinúria (defeito isolado do transporte dos aminoácidos básicos) ▪ Ramo ascendente largo da ansa de Henle ▪ Hipomagnesémia familiar com hipercalcúria e nefrocalcinose ^(a) ▪ Síndrome de Bartter pré-natal e neo-natal ^(a) ▪ Hipocalcémia autossómica dominante com hipercalcúria ^(a) ▪ Túbulo colector ▪ Acidose tubular distal primitiva ^(a) 	

Legenda: ^a Nefrocalcinose frequente. (Adaptado de: Jungers *et al*, 2008)

ANEXO - 4

Quadro A4 - Condições do analisador de aminoácidos *Biochrom 30*.

BioSys							
Sample:	<u>Physiological Fluid Std</u>	Amount Loaded:	<u>10</u>	nmol			
Column Type:	<u>Peek</u>	Column Number:	<u>u-1909</u>	Resin Batch: <u>11956</u>			
Bed Length (mm):	<u>200</u>	Diameter (mm):	<u>4.6</u>	Instrument Serial Number: <u>93746</u>			
Test Number:	<u>n/a</u>						
		Buffer		Nin			
Flow Rate (ml/h):		<u>25</u>		<u>20</u>			
Back Pressure (bar):		<u>79.5</u>		<u>9</u>			
	<u>Buffer</u>		<u>Molarity</u>	<u>pH</u>	<u>Batch #</u>		
Buffer 1 -	Lithium Citrate Buffer (A)		0.20	2.80	12377		
Buffer 2 -	Lithium Citrate Buffer (B)		0.30	3.00	12354		
Buffer 3 -	Lithium Citrate Buffer (CII)		0.50	3.15	12251		
Buffer 4 -	Lithium Citrate Buffer (DII)		0.90	3.50	12216		
Buffer 5 -	Lithium Citrate Buffer		1.65	3.55	12356		
Buffer 6 -	Lithium Hydroxide Solution		0.30	n/a	12265		
Reagent	Ninhydrin				12392		
	Ultrosolve				12412		
<u>Title:</u>	<u>93746 LiHP</u>						
Filename:	C:\Program Files\BioSys\Programs\93746 LiHP.prg						
Nin Flow Rate:	20.0 ml/h						
<u>No.</u>	<u>Time</u>	<u>Temp</u>	<u>Buffer</u>	<u>Pump</u>	<u>Nin</u>	<u>Rec</u>	<u>Commands</u>
1	01:00	34°C	1	25.0ml/h	ON	OFF	
2	00:00	34°C	1	25.0ml/h	ON	OFF	Reset
3	01:00	34°C	1	25.0ml/h	ON	OFF	Load
4	05:00	34°C	1	25.0ml/h	ON	ON	
5	31:00	34°C	2	25.0ml/h	ON	ON	
6	20:00	44°C	3	25.0ml/h	ON	ON	
7	02:00	64°C	3	25.0ml/h	ON	ON	
8	25:00	64°C	4	25.0ml/h	ON	ON	
9	38:00	81°C	5	25.0ml/h	ON	ON	
10	06:00	81°C	6	25.0ml/h	ON	ON	
11	06:00	81°C	1	25.0ml/h	ON	ON	
12	30:00	34°C	1	31.2ml/h	OFF	OFF	
13	06:00	34°C	1	25.0ml/h	ON	OFF	

ANEXO - 5

Quadro A5 - Valores retrospectivos dos aminoácidos cistina, ornitina, lisina e arginina, encontrados nos casos índice e familiares em estudo.

ID	[Cistina]	VR	Razão	[Ornitina]	VR	[Lisina]	VR	[Arginina]	VR
D1/FA	1870 µmol/24h	41-258	12.5	3761 µmol/24h	49-151	10276 µmol/24h	48-640	6151 µmol/24h	22-88
	536 µmol/mmol creat = 4743.4 µmol/gr creat	6_34	26.8	230 µmol/mmol creat = 2035.4 µmol/gr creat	0_5	919 µmol/mmol creat = 8132.7 µmol/gr creat	7_58	554 µmol/mmol creat = 4902.7 µmol/gr creat	0-5
D1/FB	62 µmol/mmol creat = 548.7 µmol/gr creat	7_23	4.1	12 µmol/mmol creat = 106.2 µmol/gr creat	0-6	232 µmol/mmol creat = 2053.1 µmol/gr creat	10_56	10 µmol/mmol creat = 88.5 µmol/gr creat	0-6
	175 µmol/mmol creat = 1548.7 µmol/gr creat	10_26	9.7	77 µmol/mmol creat = 681.4 µmol/gr creat	0-8	1995 µmol/mmol creat = 17654.9 µmol/gr creat	16-69	57 µmol/mmol creat = 504.4 µmol/gr creat	0-8
	83 µmol/mmol creat = 734.5 µmol/gr creat	10_26	4.6	32 µmol/mmol creat = 283.2 µmol/gr creat	0-8	1069 µmol/mmol creat = 9460.2 µmol/gr creat	16-69	34 µmol/mmol creat = 300.9 µmol/gr creat	0-8
	108 µmol/mmol creat = 955.8 µmol/gr creat	8_30	5.6	58 µmol/mmol creat = 513.3 µmol/gr creat	0-7	365 µmol/mmol creat = 3230.1 µmol/gr creat	10_46	40 µmol/mmol creat = 354.0 µmol/gr creat	0-9
D1/FC	3842 µmol/24h	41-258	25.6	2047 µmol/24h	49-151	17649 µmol/24h	48-640	4795 µmol/24h	22-88
	3519 µmol/24h	20-130	23.4	8008 µmol/24h	49-151	428 µmol/24h	48-640	3977 µmol/24h	22-88
D3/FC	94 µmol/24h	41-258	0.6	21 µmol/24h	49-151	442 µmol/24h	48-640	34 µmol/24h	22-88
D1/FD	2184 µmol/24h	41-258	14.5	1984 µmol/24h	49-151	11444 µmol/24h	48-640	2277 µmol/24h	22-88
	1836 µmol/24h	41-258	12.2	1878 µmol/24h	49-151	8608 µmol/24h	48-640	3140 µmol/24h	22-88
	259 µmol/mmol creat = 2292.0 µmol/gr creat	8_22	17.2	x	x	x	x	x	x
	879 µmol/mmol creat = 7778.8 µmol/gr creat	8_30	46.2	x	x	x	x	x	x
	281 µmol/mmol creat = 2486.7 µmol/gr creat	10_26	15.6	281 µmol/mmol creat = 2486.7 µmol/gr creat	x	281 µmol/mmol creat = 2486.7 µmol/gr creat	x	281 µmol/mmol creat = 2486.7 µmol/gr creat	x
	490 µmol/mmol creat = 4336.3 µmol/gr creat	10_26	27.2	544 µmol/mmol creat = 4814.2 µmol/gr creat	0-8	1200 µmol/mmol creat = 10619.5 µmol/gr creat	16-69	1112 µmol/mmol creat = 9840.7 µmol/gr creat	0-8
	702 µmol/mmol creat = 6265.5 µmol/gr creat	10_26	39.0	789 µmol/mmol creat = 6982.3 µmol/gr creat	0-8	1863 µmol/mmol creat = 16486.7 µmol/gr creat	16-69	1196 µmol/mmol creat = 10584.1 µmol/gr creat	0-8
D2/FD	2097 µmol/24h	41-258	13.9	1771 µmol/24h	49-151	10566 µmol/24h	48-640	2572 µmol/24h	22-88
	487 µmol/mmol creat = 4309.7 µmol/gr creat	13-49	15.7	550 µmol/mmol creat = 4867.3 µmol/gr creat	0-14	1154 µmol/mmol creat = 10212.4 µmol/gr creat	15-200	898 µmol/mmol creat = 7946.9 µmol/gr creat	0-12
P/FD	105 µmol/24h	41-258	0.7	41 µmol/24h	49-151	593 µmol/24h	48-640	63 µmol/24h	22-88
	6 µmol/mmol creat = 53.1 µmol/gr creat	6_34	0.3	1 µmol/mmol creat = 8.8 µmol/gr creat	0-5	44 µmol/mmol creat = 389.4 µmol/gr creat	7_58	2 µmol/mmol creat = 17.7 µmol/gr creat	0-5
M/FD	51 µmol/24h	41-258	0.34	28 µmol/24h	49-151	321 µmol/24h	48-640	13 µmol/24h	22-88
	8 µmol/mmol creat = 70.8 µmol/gr creat	6_34	0.4	2 µmol/mmol creat = 17.7 µmol/gr creat	0-5	25 µmol/mmol creat = 221.2 µmol/gr creat	7_58	2 µmol/mmol creat = 17.7 µmol/gr creat	0-5
D1/FE	494 µmol/mmol creat = 4371.7 µmol/gr creat	8_30	26.0	501 µmol/mmol creat = 4433.6 µmol/gr creat	0-7	2232 µmol/mmol creat = 19752.2 µmol/gr creat	10_46	412 µmol/mmol creat = 3646.0 µmol/gr creat	0-9
	356 µmol/mmol creat = 3150.4 µmol/gr creat	10_26	19.7	372 µmol/mmol creat = 3292.0 µmol/gr creat	0-8	1310 µmol/mmol creat = 11592.9 µmol/gr creat	16-69	439 µmol/mmol creat = 3885.0 µmol/gr creat	0-8
	356 µmol/mmol creat = 3150.4 µmol/gr creat	10_26	19.7	231 µmol/mmol creat = 2044.2 µmol/gr creat	0-8	1592 µmol/mmol creat = 14088.5 µmol/gr creat	16-69	203 µmol/mmol creat = 1796.5 µmol/gr creat	0-8
M/FE	107 µmol/24h	41-258	0.7	8 µmol/24h	49-151	280 µmol/24h	48-640	50 µmol/24h	22-88
P/FE	15 µmol/24h	41-258	0.1	4 µmol/24h	49-151	62 µmol/24h	48-640	8 µmol/24h	22-88

ID	[Cistina]	VR	Razão	[Ornitina]	VR	[Lisina]	VR	[Arginina]	VR
D1/FF	279 µmol/mmol creat = 2469.0 µmol/gr creat	8_22	18.6	261 µmol/mmol creat = 2309.7 µmol/gr creat	0-7	313 µmol/mmol creat = 2769.9 µmol/gr creat	10_68	866 µmol/mmol creat = 7663.7 µmol/gr creat	0-7
	6298 µmol/g creat = 55734.5 µmol/gr creat	117-448	26.4	2710 µmol/g creat = 23982.3 µmol/gr creat	x	18433 µmol/g creat = 163123.9 µmol/gr creat	144-782	18952 µmol/g creat = 167716.8 µmol/gr creat	x
D2/FF	2376 µmol/24h	41-258	15.8	1820 µmol/24h	49-151	11732 µmol/24h	48-640	6564 µmol/24h	22-88
	633 µmol/mmol creat = 5601.8 µmol/gr creat	8_22	42.2	379 µmol/mmol creat = 3354.0 µmol/gr creat	0-7	711 µmol/mmol creat = 6292.0 µmol/gr creat	10_68	1037 µmol/mmol creat = 9177.0 µmol/gr creat	0-7
	2243 µmol/g creat = 19849.6 µmol/gr creat	124-492	7.2	5333 µmol/g creat = 47194.7 µmol/gr creat	0-480	28814 µmol/g creat = 254991.2 µmol/gr creat	279-1017	19496 µmol/g creat = 172531.0 µmol/gr creat	x
M/FF	121 µmol/24h	41-258	0.8	19 µmol/24h	49-151	1064 µmol/24h	48-640	31 µmol/24h	22-88
D1/FG	50 µmol/mmol creat = 442.5 µmol/gr creat	6_34	2.5	31 µmol/mmol creat = 274.3 µmol/gr creat	0-7	572 µmol/mmol creat = 5061.9 µmol/gr creat	10_46	19 µmol/mmol creat = 168.1 µmol/gr creat	0-9
	88 µmol/mmol creat = 778.8 µmol/gr creat	10_26	4.9	75 µmol/mmol creat = 663.7 µmol/gr creat	0-08	1060 µmol/mmol creat = 9380.5 µmol/gr creat	16-69	21 µmol/mmol creat = 185.8 µmol/gr creat	0-8
	53 µmol/mmol creat = 469.0 µmol/gr creat	12_29	2.9	32 µmol/mmol creat = 283.2 µmol/gr creat	0-8	459 µmol/mmol creat = 4061.9 µmol/gr creat	13-79	21 µmol/mmol creat = 185.8 µmol/gr creat	0-11
M/FG	12 µmol/mmol creat = 106.2 µmol/gr creat	6_34	0.6	3 µmol/mmol creat = 26.5 µmol/gr creat	0-5	72 µmol/mmol creat = 637.2 µmol/gr creat	7_58	4 µmol/mmol creat = 35.4 µmol/gr creat	0-5
	17 µmol/mmol creat = 150.4 µmol/gr creat	6_34	0.85	4 µmol/mmol creat = 35.4 µmol/gr creat	0-5	105 µmol/mmol creat = 929.2 µmol/gr creat	7_58	5 µmol/mmol creat = 44.2 µmol/gr creat	0-5
P/FG	5 µmol/mmol creat = 44.2 µmol/gr creat	6_34	0.25	1 µmol/mmol creat = 8.8 µmol/gr creat	0-5	30 µmol/mmol creat = 265.5 µmol/gr creat	7_58	2 µmol/mmol creat = 17.7 µmol/gr creat	0-5
	6 µmol/mmol creat = 53.1 µmol/gr creat	6_34	0.3	2 µmol/mmol creat = 17.7 µmol/gr creat	0-5	42 µmol/mmol creat = 371.7 µmol/gr creat	7_58	2 µmol/mmol creat = 17.7 µmol/gr creat	0-5
D1/FH	325 µmol/mmol creat = 2876.1 µmol/gr creat	8_21	22.4	133 µmol/mmol creat = 1177.0 µmol/gr creat	0-6	1064 µmol/mmol creat = 9415.9 µmol/gr creat	10_44	85 µmol/mmol creat = 752.2 µmol/gr creat	0-6
	535 µmol/mmol creat = 4734.5 µmol/gr creat	13-48	17.2	604 µmol/mmol creat = 5345.1 µmol/gr creat	0-13	1975 µmol/mmol creat = 17477.9 µmol/gr creat	15-199	246 µmol/mmol creat = 2177.0 µmol/gr creat	0-11
D1/FI	1471 µmol/24h	41-258	9.8	612 µmol/24h	49-151	5512 µmol/24h	48-640	293 µmol/24h	22-88
	1045 µmol/24h	41-258	6.9	454 µmol/24h	49-151	3577 µmol/24h	48-640	178 µmol/mmol creat = 1575.2 µmol/gr creat	22-88
	114 µmol/mmol creat = 1008.8 µmol/gr creat	6_34	5.7	49 µmol/mmol creat = 433.6 µmol/gr creat	0-5	274 µmol/mmol creat = 2424.8 µmol/gr creat	7_58	1 µmol/mmol creat = 8.8 µmol/gr creat	0-5
	106 µmol/mmol creat = 938.1 µmol/gr creat	6_34	5.3	65 µmol/mmol creat = 575.2 µmol/gr creat	0-5	305 µmol/mmol creat = 2699.1 µmol/gr creat	7_58	26 µmol/mmol creat = 230.1 µmol/gr creat	0-5
	136 µmol/mmol creat = 1203.5 µmol/gr creat	6_34	6.8	52 µmol/mmol creat = 460.2 µmol/gr creat	0-5	377 µmol/mmol creat = 3336.3 µmol/gr creat	7_58	20 µmol/mmol creat = 177.0 µmol/gr creat	0-5
	170 µmol/mmol creat = 1504.4 µmol/gr creat	7_23	11.3	122 µmol/mmol creat = 1079.6 µmol/gr creat	0-6	483 µmol/mmol creat = 4274.3 µmol/gr creat	10_56	92 µmol/mmol creat = 814.2 µmol/gr creat	0-6
	207 µmol/mmol creat = 1831.9 µmol/gr creat	8_21	13.8	334 µmol/mmol creat = 2955.8 µmol/gr creat	0-6	438 µmol/mmol creat = 3876.1 µmol/gr creat	10_44	37 µmol/mmol creat = 327.4 µmol/gr creat	0-6
	524 µmol/mmol creat = 4637.2 µmol/gr creat	8_30	27.5	72,4 µmol/mmol creat = 640.7 µmol/gr creat	0-7	859,7 µmol/mmol creat = 7608.0 µmol/gr creat	10_46	44,3 µmol/mmol creat = 392.0 µmol/gr creat	0-9
	512,9 µmol/mmol creat = 4538.9 µmol/gr creat	10_26	28.5	70,3 µmol/mmol creat = 622.1 µmol/gr creat	0-8	722,3 µmol/mmol creat = 6392.0 µmol/gr creat	16_69	38,4 µmol/mmol creat = 339.8 µmol/gr creat	0-8
D2/FI	35 µmol/mmol creat = 309.7 µmol/gr creat	6_34	1.75	8 µmol/mmol creat = 70.8 µmol/gr creat	0_5	179 µmol/mmol creat = 1584.1 µmol/gr creat	7_58	4 µmol/mmol creat = 35.4 µmol/gr creat	0-5
	223 µmol/24h	41-258	1.6	52 µmol/24h	49-151	1156 µmol/24h	48-640	36 µmol/24h	22-88
	222 µmol/24h	41-258	1.5	62 µmol/24h	49-151	1456 µmol/24h	48-640	45 µmol/24h	22-88
	113 µmol/24h	41-258	0.7	25 µmol/24h	49-151	518 µmol/24h	48-640	29 µmol/24h	22-88
	21 µmol/mmol creat = 185.8 µmol/gr creat	7_23	1.4	4 µmol/mmol creat = 35.4 µmol/gr creat	0-6	80 µmol/mmol creat = 708.0 µmol/gr creat	10_56	3 µmol/mmol creat = 26.5 µmol/gr creat	0-6
	46 µmol/mmol creat = 407.1 µmol/gr creat	8_21	3.0	18 µmol/mmol creat = 159.3 µmol/gr creat	0-6	238 µmol/mmol creat = 2106.2 µmol/gr creat	10_44	18 µmol/mmol creat = 159.3 µmol/gr creat	0-6

ID	[Cistina]	VR	Razão	[Ornitina]	VR	[Lisina]	VR	[Arginina]	VR
	16 µmol/mmol creat = 141.6 µmol/gr creat	8_22	1.0	16 µmol/mmol creat = 141.6	0-7	64 µmol/mmol creat = 566.4 µmol/gr creat	10_68	3 µmol/mmol creat = 26.5 µmol/gr creat	0-7
M/FI	274 µmol/24h	41-258	1.8	72 µmol/24h	49-151	885 µmol/24h	48-640	45 µmol/24h	22-88
	3 µmol/mmol creat = 26.5 µmol/gr creat	6_34	0.15	1 µmol/mmol creat = 8.8 µmol/gr creat	0-5	12 µmol/mmol creat = 106.2 µmol/gr creat	26-153	1 µmol/mmol creat = 8.8 µmol/gr creat	0-5
P/FI	156 µmol/mmol creat = 1380.1 µmol/gr creat	6_34	7.8	54 µmol/mmol creat = 477.9 µmol/gr creat	0-5	458 µmol/mmol creat = 4053.1 µmol/gr creat	7_58	18 µmol/mmol creat = 159.3 µmol/gr creat	0-5
	98 µmol/mmol creat = 867.3 µmol/gr creat	6_34	4.9	74 µmol/mmol creat = 654.9 µmol/gr creat	0-5	256 µmol/mmol creat = 2265.5 µmol/gr creat	7_58	29 µmol/mmol creat = 256.6 µmol/gr creat	0-5
	100 µmol/mmol creat = 885.0 µmol/gr creat	6_34	5.0	35 µmol/mmol creat = 309.7 µmol/gr creat	0-5	357 µmol/mmol creat = 3159.3 µmol/gr creat	7_58	22 µmol/mmol creat = 194.7 µmol/gr creat	0-5
	2265 µmol/24h	41-258	15.1	937 µmol/24h	49-151	9228 µmol/24h	48-640	418 µmol/24h	22-88
	142 µmol/mmol creat = 1256.6 µmol/gr creat	6_34	7.1	292 µmol/mmol creat = 2584.1 µmol/gr creat	0-5	252 µmol/mmol creat = 2230.1 µmol/gr creat	7_58	31 µmol/mmol creat = 274.3 µmol/gr creat	0-5
D1/FJ	1153 µmol/24h	41-258	7.7	1603 µmol/24h	49-151	2849 µmol/24h	48-640	3581 µmol/24h	22-88
	3986 µmol/24h	41-258	26.6	2124 µmol/24h	49-151	5664 µmol/24h	48-640	4178 µmol/24h	22-88
M/FJ	23 µmol/24h	41-258	0.15	7 µmol/24h	49-151	61 µmol/24h	48-640	7 µmol/24h	22-88
D1/FL	921 µmol/24h	41-258	6.1	379 µmol/24h	49-151	2750 µmol/24h	48-640	241 µmol/24h	22-88
	121 µmol/mmol creat = 1070.8 µmol/gr creat	8_21	8.0	82 µmol/mmol creat = 725.7 µmol/gr creat	0-6	709 µmol/mmol creat = 6274.3 µmol/gr creat	10_44	49 µmol/mmol creat = 433.6 µmol/gr creat	0-6
D2/FL	406 µmol/24h	41-258	2.7	155 µmol/24h	49-151	1463 µmol/24h	48-640	94 µmol/24h	22-88
M/FL	55 µmol/24h	41-258	0.4	15 µmol/24h	49-151	190 µmol/24h	48-640	15 µmol/24h	22-88
	6 µmol/mmol creat = 53.1 µmol/gr creat	6_34	0.3	2 µmol/mmol creat = 17.7 µmol/gr creat	0_5	18 µmol/mmol creat = 159.3 µmol/gr creat	7_58	10 µmol/mmol creat = 88.5 µmol/gr creat	0-5
D1/FK	2821 µmol/24h	41-258	18.8	1962 µmol/24h	49-151	12330 µmol/24h	48-640	4406 µmol/24h	22-88
	2957 µmol/24h	41-258	19.7	2003 µmol/24h	49-151	12159 µmol/24h	48-640	5163 µmol/24h	22-88
	2147 µmol/24h	41-258	14.3	1450 µmol/24h	49-151	7275 µmol/24h	48-640	4494 µmol/24h	22-88
	3802 µmol/24h	41-258	25.3	2896 µmol/24h	49-151	14866 µmol/24h	48-640	5923 µmol/24h	22-88
	2733 µmol/24h	41-258	18.2	x	x	x	x	x	x
	3454 µmol/24h	41-258	23.0	x	x	x	x	x	x
D3/FK	1092 µmol/24h	41-258	7.28	15550 µmol/24h	49-151	489 µmol/24h	48-640	4580 µmol/24h	22-88
	2700 µmol/24h	41-258	18.0	2332 µmol/24h	49-151	9440 µmol/24h	48-640	5728 µmol/24h	22-88
	1657 µmol/24h	41-258	11.0	2479 µmol/24h	49-151	17503 µmol/24h	48-640	7099 µmol/24h	22-88
	2252 µmol/24h	41-258	15.0	x		x	x	x	x
	3096 µmol/24h	41-258	20.6	1624 µmol/24h	49-151	10769 µmol/24h	48-640	5366 µmol/24h	22-88
	3308 µmol/24h	41-258	22.0	x	x	x	x	x	x
	2284 µmol/24h	41-258	15.2	2075 µmol/24h	49-151	5849 µmol/24h	48-640	5191 µmol/24h	22-88
	2903 µmol/24h	41-258	19.3	x	x	x	x	x	x
D4/FK	8 µmol/mmol creat = 70.8 µmol/gr creat	6_34	0.4	1 µmol/mmol creat = 8.8 µmol/gr creat	0-5	39 µmol/mmol creat = 345.1 µmol/gr creat	7_58	2 µmol/mmol creat = 17.7 µmol/gr creat	0-5
D5/FK	43 µmol/24h	41-258	0.3	6 µmol/24h	49-151	136 µmol/24h	48-640	13 µmol/24h	22-88
P/FK	828 µmol/24h	41-258	5.5	372 µmol/24h	49-151	2042 µmol/24h	48-640	206 µmol/24h	22-88

Legenda: ID-Identificação; VR- valor de referência; D1- caso índice; D2, D3, D4, D5- identificação de outros familiares; F- família; A a L- codificação utilizada para identificar as famílias. A ordem sequencial dos valores das concentrações dos aminoácidos é da mais recente para a mais antiga.

ANEXO – 6

Quadro A6 - Concentração dos aminoácidos publicados pelo ICC em 2001.

Cistinúria não-tipo I	N	Cistina	Lisina	Arginina	Ornitina	Soma
Homozigotos ^a	67-71	1530±113 ^b (445-3201)	6171±378 ^b (1952-11309)	3244±211 ^b (469-5887)	1805±112 ^b (367-3231)	12681±639 ^b (4774-22854)
Parentes considerados heterozigotos ^c	6-7	513±83 (339-771)	2735±278 ^b (2029-3667)	124±33 (34-235)	288±67 (121-519)	3565±391 ^b (2715-4814)
Heterozigotos obrigatórios	128	430±33 ^d (87-1069)	1692±120 ^d (217-4489)	96±14 ^d (1-360)	172±19 ^d (17-488)	2390±162 ^d (440-6594)
Controlos	34	40±3 (18-61)	118±10 (50-227)	8±6 (0-72)	21±4 (1-72)	197±18 (94-350)

- a) Os valores dos aa estão expressos em creatinina ($\mu\text{mol/g}$ de creatinina).
b) O percentil 5-95 de cada valor está entre parêntesis.
c) n é o numero de indivíduos estudados.
d) ^a Doentes considerados como tendo 2 alelos afectados. Os Controlos são relativos a doentes cistinúricos sem mutações nos 2 genes, identificados nas suas famílias, e/ou que não transmitiram cistinúria.
e) ^b valores significativamente altos em relação aos heterozigotos obrigatórios ($P \leq 0.05$)-Student's test.
f) ^c os níveis de aa urinários de familiares considerados heterozigotos
g) ^d valores significativamente altos em relação aos controlos e com $p \leq 0.001$ - Student's test.
(Adaptado de: *International Cystinuria Consortium*, 2001)

ANEXO – 7

Quadro A7 - Alterações encontradas no gene *SLC3A1* e respectiva codificação utilizada na construção de haplotipos.

Posição c.DNA	nt	Varição	Designação
c.114	A	WT	1
	C	p.G38G	2
c.231	T	WT	1
	A	p.S77S	2
c.611-2	A	WT	1
	C	c.611-2A>C	2
c.647	C	WT	1
	T	p.T216M	2
c.797	T	WT	1
	C	p.F266S	2
c.1035	G	WT	1
	A	p.E345E	2
c.1136+44	G	WT	1
	A	c.1136+44G>A	2
c.1136+3	T	WT	1
	—	c.1136+3delT	2
c.1190	A	WT	1
	G	p.Y397C	2
c.1332+7	C	WT	1
	T	c.1332+7C>T	2
c.1400	T	WT	1
	C	p.M467T	2
c.1597	T	WT	1
	A	p.Y533N	2
c.1854	G	WT	1
	A	p.M618I	2
c.2019	C	WT	1
	G	p.C673W	2
c.*70A>G	A	WT	1
	G	c.*70A>G	2

Legenda: A preto estão assinalados os polimorfismos descritos, a verde as alterações encontradas neste estudo e a vermelho as mutações descritas na literatura.

ANEXO - 8

Quadro A8 - Alterações encontradas no gene *SLC7A9* e respectiva codificação utilizada na construção de haplotipos.

Posição c.DNA	nt	Variação	Designação
c.1-39	C	WT	1
	T	c.1-39C>T	2
c.216	C	WT	1
	T	p.C72C	2
c.235	T	WT	1
	G	c.235+22T>G	2
c.399	C	WT	1
	T	p.S133S	2
c.411	T	WT	1
	C	p.C137C	2
c.425	T	WT	1
	C	p.V142A	2
c.478+10	T	WT	1
	C	c.478+10T>C	2
c.507	C	WT	1
	T	p.S169S	2
c.562	G	WT	1
	A	p.V188M	2
c.604+1	G	WT	1
	A	c.604+1G>A	2
c.604+10	G	WT	1
	A	c.604+10G>A	2
c.604+24	T	WT	1
	C	c.604+24T>C	2
c.614_615 insA	=	WT	1
	A	c.614_615 insA	2
c.667	C	WT	1
	A	p.L223M	2
c.687	C	WT	1
	T	p.L229L	2
c.874-39	A	WT	1
	G	c.874-39A>G	2
c.972	G	WT	1
	A	p.A324A	2
c.977	A	WT	1
	G	c.977+51A>G	2
c.1074+68	C	WT	1
	T	c.1074+68C>T	2
c.1119	G	WT	1
	A	p.S373S	2
c.1143	C	WT	1
	A	p.A381A	2
c.1365	C	WT	1
	T	p.V455V	2
c.1399+4delAGTA	AGTA	WT	1
	=	=	2
c.*82	C	WT	1
	T	c.*82C>T	2

Legenda: A preto estão assinalados os polimorfismos descritos, a verde as alterações encontradas neste estudo, a vermelho as mutações descritas na literatura, a azul as alterações "não silenciosas" e a laranja o polimorfismo que altera o cDNA.