

# Cistinúria – Revisão da Literatura e Investigação das Suas Bases Genéticas em 4 Doentes

Altina Lopes<sup>1</sup>, Mafalda Barbosa<sup>2</sup>, Conceição Mota<sup>3</sup>, Sandra Alves<sup>4</sup>, Esmeralda Martins<sup>5</sup>,  
Maria do Céu Mota<sup>6</sup>, Dulce Quelhas<sup>1</sup>, Lúcia Lacerda<sup>1</sup>, Maria Luísa Cardoso<sup>1,7</sup>

## RESUMO

**Introdução:** Classicamente, e com base na apresentação fenotípica, os doentes com cistinúria classificavam-se em tipo I e tipo não I. Mais recentemente e com base nos aspectos genéticos da doença podemos identificar: o tipo A, causada por mutações no gene *SLC3A1*, o tipo B, causada por mutações no gene *SLC7A9*

**Objectivos e metodologia:** O objectivo deste trabalho foi rever o estado actual do conhecimento no que se refere ao diagnóstico, incidência/prevalência, classificação bioquímica, aspectos genéticos e tratamento desta patologia e caracterizar a nível molecular quatro casos com diagnóstico clínico e/ou bioquímico de cistinúria através da sequenciação dos genes *SLC3A1* e *SLC7A9*.

**Resultados:** No gene *SLC3A1* foram detectadas cinco mutações, duas das quais são novas (c.1597T>A e c.611-2A>C) e três previamente descritas na literatura (c.647C>T; c.1190A>G e c.2019C>G). A sequenciação do gene *SLC7A9* revelou a presença de uma mutação previamente descrita (c.614\_615insA). Foi possível classificar três doentes tipo A (um homocigoto e dois heterocigotos compostos) e um doente como heterocigoto tipo B, o que está de acordo com a excreção urinária de cistina observada.

**Conclusões:** A caracterização genotípica dos doentes cistinúricos contribui

para o esclarecimento da patofisiologia da doença, permite efectuar a confirmação do diagnóstico clínico e bioquímico e oferecer o aconselhamento genético aos familiares em risco. Os autores salientam a importância de uma abordagem multidisciplinar na estratégia de seguimento destes doentes.

**Palavras-chave:** cistinúria, litíase renal, aminoácidos, cistina, *SLC3A1*, *SLC7A9*.

Nascer e Crescer 2010; 19(4): 244-250

## INTRODUÇÃO

A cistinúria (OMIM #220100) é uma doença hereditária do transporte renal de aminoácidos, caracterizada pelo aumento da excreção urinária de cistina e de aminoácidos básicos (lisina, arginina e ornitina). A patologia é causada por um defeito no mecanismo de transporte luminal partilhado por estes aminoácidos nas células epiteliais dos túbulos renais e do tracto gastrointestinal. A expressão do défice a nível intestinal não tem consequências clínicas (uma vez que é compensada pela absorção de oligopéptidos) mas a nível renal verifica-se uma fraca reabsorção destes aminoácidos o que conduz à sua hiperexcreção urinária<sup>(1,2,3,4)</sup>. Dada a elevada concentração e baixa solubilidade da cistina na urina a pH fisiológico, esta precipita nos túbulos renais, levando à formação de cálculos<sup>(5)</sup>.

Este artigo tem duas vertentes: 1) Rever o estado actual do conhecimento relativamente à cistinúria, 2) Apresentar os resultados preliminares do estudo molecular dos doentes portugueses seguido da sua classificação genética.

## Diagnóstico diferencial da cistinúria

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 na maioria das vezes são resultantes de processos multifactoriais<sup>(6)</sup>. A cistinúria representa cerca de 77% do total das litíases genéticas.

A suspeita de cistinúria é elevada se (i) os sintomas iniciais surgirem na primeira ou segunda décadas de vida, (ii) a formação de cálculos for recorrente, (iii) houver história familiar de litíase renal e (iv) se a análise microscópica do sedimento urinário de uma micção recente revelar cristais hexagonais típicos de cistina<sup>(3,5)</sup>.

Tal como os demais cálculos renais, os de cistina são de fácil diagnóstico por ecografia e são pouco rádio-opacos aos raios-X (devido ao seu conteúdo em enxofre), sendo também facilmente detectáveis por espectroscopia. No entanto, os cristais de cistina são observados em apenas 20-25% dos doentes cistinúricos e dado que a sua ausência não exclui o diagnóstico, é necessário realizar testes adicionais para a clarificação da etiologia da apresentação clínica. O teste de nitroprussiato de sódio, ou teste de Brand, apesar de constituir um método rápido, não é actualmente utilizado por não ser quantitativo e dar resultados falsamente positivos [nomeadamente na presença de outros aminoácidos como a homocistina, de cetonúria e de alguns metabolitos medicamentosos<sup>(7)</sup>].

O diagnóstico final é feito por quantificação dos aminoácidos cistina, lisina, ornitina e arginina na urina, normalmente por cromatografia líquida de troca-iónica.

<sup>1</sup> Unid. Bioquímica Genética, CGMJM, INSA

<sup>2</sup> Unidade de Genética Médica, CGMJM, INSA

<sup>3</sup> S. Nefrologia Pediátrica, HMP, CHPorto

<sup>4</sup> Unidade de Investigação, CGMJM, INSA

<sup>5</sup> Consulta de Metabolismo do HMP, CHPorto

<sup>6</sup> Consulta de Genética do HMP, CHPorto

<sup>7</sup> Laboratório de Bioquímica, FFUP

A colheita de urina de 24 horas, embora seja problemática nas crianças, é no entanto necessária para decidir a abordagem terapêutica e para fazer o controlo periódico. Se não for possível obter uma urina de 24 horas, a razão entre cistina/creatinina numa amostra aleatória de urina pode ser informativa e nalguns casos permite fazer a distinção entre os doentes homocigotos (ou heterocigotos compostos) e os portadores (heterocigotos). Além disso, pode permitir o acompanhamento eficaz da estratégia de tratamento<sup>(3)</sup>. A colheita deve obedecer a determinados requisitos de modo a evitar a obtenção de valores falsamente baixos de cistina na amostra, pelo que é aconselhável promover a sua solubilização com a adição de bicarbonato de sódio até pH>7,5.

O recurso a estudos moleculares é a etapa final já que a identificação das mutações responsáveis pela patologia permite a confirmação do diagnóstico em definitivo.

#### Incidência e Prevalência

A prevalência global da cistinúria na população é de cerca de 1/7.000 podendo oscilar entre 1/2.500 e 1/15.000, consoante a etnia e a origem geográfica das populações estudadas<sup>(8)</sup>. É difícil estimar este parâmetro com precisão, porque a metodologia difere nos diversos estudos realizados e algumas das abordagens apresentam limitações significativas<sup>(4)</sup>. No Quadro I sumarizam-se os resultados de alguns estudos realizados em diferentes populações.

#### Classificação bioquímica

A classificação dos casos de cistinúria pode ser feita com base em diversos critérios (Quadro II). Alguns autores baseiam-se no fenótipo apresentado e na excreção urinária de cistina e aminoácidos básicos pelos heterocigotos obrigatórios, distinguindo três tipos de cistinúria: tipo I (forma clássica), com portadores silenciosos e em que só os homocigotos formam cálculos; tipo II e tipo III, em que os portadores apresentam excreção respectivamente elevada e moderada de cistina e podem formar cálculos<sup>(5,7)</sup>.

Mais recentemente, após a associação da cistinúria tipo I ao *locus* SL-

C3A1 e das cistinúrias tipo II e III ao *locus* SLC7A9, Feliubadaló e colaboradores, reforçaram a ideia que já vinha a ser proposta de que as cistinúrias do tipo II e III devem ser consideradas em conjunto e designadas como tipo não-I<sup>(9)</sup>. Os homocigotos, tanto do tipo I como do tipo não-I, apresentam hiperexcreção de cistina com níveis de concentração semelhantes<sup>(10)</sup>.

Há ainda a referir a cistinúria transitória neonatal, descrita pela primeira vez por Scriver *et al.* em 1985, em crianças heterocigóticas para cistinúria. Estes doentes apresentavam um decréscimo progressivo nos níveis de cistina urinária desde o período neonatal até aos 2-3 anos de idade correspondendo a um aumento da maturidade do sistema de transporte<sup>(11)</sup>.

**Quadro I - Prevalência / Incidência da Cistinúria em várias populações.**

País / População	Prevalência / Incidência	Referência Bibliográfica	Observações
Inglaterra	1/2 000	1; 5; 7	Rastreio neonatal
Judeus Israelitas da Líbia	1/2 500	1; 7; 3; 5; 17	Rastreio neonatal
Austrália	1/4 000	1; 5; 7	Rastreio neonatal
Estados Unidos	1/1 000-17 000	1; 3; 7	Rastreio neonatal
Valência (Espanha)	1/1 887	1; 7	Estudo de aa <sup>(*)</sup> (HPLC)
Quebec	1/7 200	1	Rastreio neonatal
Suécia	1/100 000	1; 3; 5	Metodologia Indefinida
Japão	1/18 000	5	Metodologia Indefinida
França	1/20 000 (incidência dos homocigotos)	6	Metodologia Indefinida
Eskisehir (Turquia)	1/2 065	28	Teste de Brand; Estudo dos aa <sup>(*)</sup>
Canadá	1/12 500	28	Metodologia Indefinida

(\*) aa-aminoácidos

**Quadro II - Concentração de cistina urinária em diferentes grupos de indivíduos.**

Grupo	Concentração de cistina urinária
População normal	< 30 mg/dia (0.13 mmol/dia) 0-100 µmol/g creatinina
Homocigotia para a cistinúria (formam cálculos)	> 400 mg/dia (1.7 mmol/dia) > 1.000 µmol/g creatinina > 113,12 µmol cistina/mmol creatinina
Heterocigotos tipo I (não formam cálculos)	< 200 mg/dia (0.8 mmol/dia) 0-100 µmol/g creatinina
Heterocigotos tipo II e III (não-I) (podem formar cálculos)	200-400 mg/dia (0.8-1.7 mmol/dia) 990-1740 e 100-600 µmol/g creatinina

(Adaptado de Biyani *et al.*, 2006<sup>(5)</sup>; Guillén *et al.*, 1999<sup>(7)</sup>).

## Genética

O modo de transmissão desta patologia urológica foi pela primeira vez descrito como sendo recessivo em 1955. Contudo sabemos hoje que o seu padrão de hereditariedade é bastante mais complexo, e apesar de classicamente ter sido considerada uma doença monogénica, é na realidade uma patologia com hereditariedade (no mínimo) digénica<sup>(12)</sup>.

O gene *SLC3A1* (OMIM \*104614) está localizado no *locus* 2p21 e codifica a subunidade glicoproteica pesada do transportador (rBAT) das células renais e epiteliais (11,13). Estão descritas, na base de dados *Human Gene Mutation Database (HGMD)* até à data, 133 mutações no gene *SLC3A1* em doentes com cistinúria. A mutação p.M467T (c.1400T>C) é a mais frequente<sup>(2)</sup>.

O segundo gene, *SLC7A9* (OMIM \*604144) localiza-se no *locus* 19q13.1 e codifica a cadeia leve (b<sup>0</sup>+AT) do transportador<sup>(13)</sup>. As mutações neste gene causam cistinúria tipo não-I e estão descritas, até à data, 98 mutações na base de dados *HGMD*. Neste gene a mutação p.G105R (c.313G>A) é a alteração causal mais frequente<sup>(14)</sup>.

Em 2002, Dello Strologo e colaboradores sugeriram uma nova classificação dos doentes com cistinúria, baseada nos estudos genéticos: i) tipo A: causada por mutações no gene *SLC3A1* (neste grupo os heterozigotos têm excreção normal de aminoácidos, ii) tipo B: cistinúria causada por mutações no gene *SLC7A9* (em que os heterozigotos normalmente têm um aumento da excreção urinária de cistina e aminoácidos dibásicos)<sup>(15)</sup>.

Devido ao facto de não se detectarem mutações nestes dois genes em muitos doentes cistinúricos, foi considerada a possibilidade de existir um terceiro gene causador de cistinúria - *SLC7A10*, o que não se confirmou<sup>(16)</sup>.

Para além das situações de cistinúria isolada estão também descritos na bibliografia fenótipos que associam a cistinúria a uma constelação de outros sinais e sintomas num espectro clínico que varia de ligeiro a grave nomeadamente o Síndrome de Hipotonia-Cistinúria e o Síndrome de Deleção 2p21<sup>(17,18,19,20)</sup>.

## 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 inclui: i) o aumento na ingestão de fluídos, ii) a dieta com baixo teor em sal e iii) a alcalinização da urina<sup>(21)</sup>.

Uma vez que no organismo a metionina é metabolizada a cistina, uma redução na ingestão deste aminoácido, poderia reduzir a excreção urinária de cistina, mas infelizmente a restrição dietética não é bem aceite pelos doentes<sup>(6)</sup>. Estudos recentes demonstraram que é possível conseguir reduzir a excreção de cistina mediante restrição de sódio.<sup>(22)</sup>

Teoricamente uma redução proteica (0,8 a 1 g/kg/dia) poderia ser benéfica, contudo não há estudos que comprovem inequivocamente esse benefício a longo prazo e uma vez que a restrição proteica pode ter efeitos negativos no crescimento da criança não é prática clínica restringir as proteínas nos doentes cistinúricos. Por outro lado, a restrição salina não tem qualquer inconveniente devendo ser aconselhada dieta sem sal acrescentado.

O factor mais importante do tratamento é por conseguinte o aumento da ingestão de fluídos, que tem um papel preponderante na redução da concentração da cistina urinária. Teoricamente consegue-se prevenir o aparecimento de cálculos recorrentes em cerca de um terço dos doentes apenas com a hidratação (deve ser bebido 1 litro de água por cada milimole de cistina excretada). Infelizmente é extremamente difícil conseguir adesão a estes valores de ingestão hídrica na criança, pelo que normalmente esta medida não é considerada como eficaz quando tomada como opção terapêutica isolada. É importante que o doente proceda não só à hidratação ao longo do dia mas que também assegure a diurese ao longo da noite. Para garantir a noctúria, o doente deve beber antes de deitar e durante a noite após as micções<sup>(3)</sup>. Sendo a cistina muito mais solúvel a pH alcalino, bebi-

das alcalinizantes ricas em bicarbonato e com baixo teor em sódio (1500 mg HCO<sub>3</sub>/L, máximo 500 mg de sódio/L) podem ser benéficas (chás, sumos cítricos e água mineral)<sup>(6)</sup>. A alcalinização urinária requer geralmente a prescrição de citrato ou bicarbonato de potássio, divididos por três a quatro tomas diárias, devendo a última ser realizada antes de deitar de modo a que a alcalinização se efectue no período nocturno. Na prática clínica inicia-se por uma dose de 1 a 2 mEq/Kg/dia de citrato ou bicarbonato de potássio, sendo a dose posteriormente ajustada até 3 a 4 mEq/kg/dia, de modo a que se obtenha um pH urinário ≥7. Uma vez que o aumento do pH urinário pode aumentar a excreção de cálcio e ácido úrico e diminuir a solubilidade de fosfato de cálcio, a administração destes compostos deve ser efectuada de forma moderada, e controlada através da avaliação periódica da excreção de cálcio e ácido úrico, para evitar o risco de formação de cálculos de fosfato de cálcio.

O sucesso da hidratação pode ser monitorizado pelo próprio através do registo da densidade da urina usando tiras de medição de Nitrazina. A meta a atingir é um valor igual ou inferior a 1,010 e um pH urinário igual ou superior a 7<sup>(6)</sup>.

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 controversa dada a possibilidade de incrementar a concentração urinária de oxalatos<sup>(3)</sup>.

O fracasso nas medidas anteriores implica o recurso ao tratamento com compostos sulfidrilicos ou quelantes (D-penicilamina ou α-mercaptopropionilglicina), que reduzem a cistina a dissulfitos mistos que são mais solúveis. O controlo regular é muito importante na monitorização do tratamento e da função renal, permitindo detectar atempadamente o aparecimento de cálculos<sup>(3,8)</sup>.

Quando os doentes não respondem às medidas preventivas recorre-se então a outras intervenções terapêuticas nomeadamente: litotricia via onda de choque extracorporeal, ureteroscopia, nefrolitoto-

mia percutânea ou ainda a cirurgia convencional. Apesar das várias opções terapêuticas, médicas e cirúrgicas, alguns doentes são refractários ao tratamento e progridem para a insuficiência renal devido à recorrente formação e rápido crescimento dos cálculos<sup>(22)</sup>.

Em 2003 Feliubadaló e colaboradores descreveram ratinhos transgênicos para cistinúria. Este modelo animal tem potencial no estudo de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da litíase renal<sup>(23,24)</sup>.

### DOENTES E METODOLOGIA

Foi feito o levantamento das famílias seguidas na consulta do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães - INSA e no Hospital Maria Pia - CHP e foram seleccionados quatro doentes com diagnóstico clínico e/ou bioquímico de cistinúria previamente estabelecido (Quadro III). Sempre que possível foram também estudados os familiares em primeiro grau.

O DNA, extraído de sangue periférico, foi submetido a PCR usando *primers* específicos para amplificação dos 10 exões do gene *SLC3A1* e dos 13 exões do *SLC7A9*. Posteriormente cada um dos exões e respectivas sequências flanqueadoras intrónicas, foram submetidos a sequenciação automática. Para avaliação da patogenicidade das alterações novas encontradas utilizaram-se os programas bioinformáticos *Polymorphism Phenotyping (Polyphen)* e *Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)*.

### RESULTADOS

A sequenciação do gene *SLC3A1* do doente 1 revelou a presença de duas mutações *missense*: uma no exão 3 (c.647C>T; p.T216M) e outra no exão 7 (c.1190A>G; p.Y397C), previamente descritas na literatura (Quadro IV). O valor de excreção de cistina urinária (536 µmol/mmol creatinina; VR: 6-34) é consideravelmente elevado neste doente pelo que a sua classificação genética é de **heterozigoto composto tipo A (AA)**.

A sequenciação do gene *SLC7A9* apenas revelou a presença de um polimorfismo previamente descrito em heterozigotia,

O doente 2 apresenta no gene *SLC3A1* um polimorfismo descrito, enquanto que a sequenciação do gene *SLC7A9* revelou a presença da mutação patogénica previamente descrita na literatura c.614\_615insA em heterozigotia. Como este doente é assintomático (não apre-

senta litíase), tendo sido diagnosticado casualmente no decurso da investigação clínica de um atraso cognitivo e apresenta um aumento moderado da excreção urinária de cistina (62 µmol/mmol creatinina; VR: 7-23) o que permite estabelecer uma classificação de **heterozigoto tipo B**.

**Quadro III** - Resumo da informação clínica disponível relativamente 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	Conservador	Cirúrgico	
1	M	N	Irmã	14A	14A	23A	N	N	UL	Água Captopril	N	Estudo familiar de cistinúria
2	M	N	N	AS	8M	10A	N	N	N	Água Citrato de sódio	N	Atraso cognitivo
3	F	N	3 irmãos	14A	30A	53A	N	S	BL	Água Litotricia	Nefrostomia (3x) rim esquerdo	Intolerância à Penicilamina e a Uralyt
4	M	N	Irmã	7M	7M	26A	N	S	BL	Água Uralyt Litotricia	Nefrostomia rim esquerdo	-

CS - consanguinidade; ID - idade de diagnóstico; ITU - infecções do tracto urinário; UL - Unilateral; AS - assintomático; BL - bilateral; N - não; F - feminino; M - masculino.

**Quadro IV** - Classificação bioquímica versus molecular dos 4 casos de cistinúria.

Casos índice	Litíase	Concentração Cys	Classificação bioquímica		Classificação genética				Tipo
			fenótipo dos doentes	excreção de Cys dos progenitores	<i>SLC3A1</i>		<i>SLC7A9</i>		
					Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	
1	Sim	↑↑	Heterozigoto composto tipo I	ND	c.647C>T	c.1190A>G	-	-	A/A
2	Não	↑	Heterozigoto não tipo I	ND	-	-	c.614_615insA	-	B/-
3	Sim	↑↑↑	Homozigoto tipo I	ND	c.1597T>A	c.1597T>A	-	-	A/A
4	Sim	↑↑	Heterozigoto composto tipo I	Indefinido	c.611-2A>C	c.2019C>G	-	-	A/A

↑↑ - excreção marcada; ↑ - excreção moderada; ↑↑↑ - excreção muito elevada; ND - não disponível.

O **doente 3** apresenta uma excreção elevada de cistina na urina (3842 µmol/24h; VR: 41-258) tendo sido classificado bioquimicamente como homozigoto tipo I. Estes dados estão em concordância com o facto de o estudo do gene *SLC3A1* revelar que o doente é homozigoto para uma mutação nova: c.1597T>A (p.Y533N<sup>(\*)</sup>).

Este doente é também portador de 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, no entanto figuram na base de dados *HGMD* como mutações causais dado que diminuem ligeiramente o transporte de cistina<sup>(25,26)</sup>. Este doente deverá, após o presente estudo molecular, ser classificado em termos genéticos como **homozigoto tipo A (AA)**.

A sequenciação do gene *SLC3A1* revelou que o **doente 4** e o seu irmão são heterozigotos compostos de duas mutações: 2019C>G (p.C673W), previamente descrita na literatura como causadora de cistinúria, e c.611-2A>C<sup>(\*\*)</sup> uma mutação de *splicing* descrita pela primeira vez neste trabalho. Ambos podem ser classificados em termos genéticos como **heterozigotos compostos tipo A (AA)**.

Adicionalmente, o estudo efectuado permitiu detectar a presença da alteração descrita c.797T>C (p.F266S), provavelmente não causal uma vez que estudos funcionais comprovaram que esta mutação não modifica significativamente a actividade de transporte quando comparado com o *wild-type* (27). A excre-

ção urinária de cistina no doente 4 está, como seria de esperar, significativamente aumentada (279 µmol/mmol creatinina; VR: 8-22).

A sequenciação do gene *SLC7A9* detectou a presença de um polimorfismo não descrito na literatura (c.216C>T).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apesar de terem passado 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<sup>(21)</sup>, a cistinúria permanece um tema actual de investigação em saúde.

Como foi referido anteriormente o perfil de aminoácidos urinários constitui uma primeira abordagem para o diagnóstico e posterior classificação bioquímica dos doentes. A classificação molecular de cistinúria teve início com a clonagem do gene *SL3CA1* em 1994 mas só cinco anos mais tarde 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. Não existindo dados disponíveis relativamente à população portuguesa, pretendemos, com este trabalho, iniciar a caracterização molecular dos doentes portugueses com cistinúria, recorrendo à sequenciação das regiões codificantes dos dois genes em causa. Foram estudados quatro casos com diagnóstico clínico e/ou bioquímico de cistinúria, tendo sido detectadas cinco mutações no gene *SLC3A1*, duas das quais não tinham sido previamente descritas na literatura, e uma no gene *SLC7A9*. Na sua maioria, as mutações causais detectadas apresentavam-se no gene *SLC3A1* o que está de acordo com o que está descrito na literatura. Não foi encontrado, até ao momento, nenhum caso de hereditariedade digénica.

A caracterização genotípica dos doentes cistinúricos contribui para o esclarecimento da patofisiologia da doença e sendo esta uma patologia tratável a análise molecular permite efectuar a confirmação do diagnóstico clínico e bioquímico e oferecer o aconselhamento genético aos

familiares em risco. Estes conhecimentos são importantes para a personalização do acompanhamento, cuidados antecipatórios e tratamento destes doentes.

Deu-se assim início ao estudo genético da cistinúria no nosso país. Este trabalho vai prosseguir com a caracterização molecular dos restantes casos de cistinúria identificados, tendo sido organizada uma equipa multidisciplinar que inclui médicos de diferentes especialidades (Nefrologia pediátrica, Nefrologia de adultos e Genética Médica) em estreita colaboração com a equipa laboratorial, para uma abordagem integrada dos doentes cistinúricos.

A continuação do estudo das bases moleculares da cistinúria na população portuguesa irá proporcionar conhecimento científico que contribuirá para o estabelecimento da relação genótipo/fenótipo de uma das causas de urolitíase familiar mais frequentes na população pediátrica.

## EM DESTAQUE

Iniciou-se o estudo genético da cistinúria no nosso país.

Neste primeiro estudo foram detectadas, no gene *SLC3A1*, cinco mutações, duas das quais são novas.

A caracterização genotípica dos doentes contribui para o esclarecimento da patofisiologia da doença, e permite efectuar a confirmação do diagnóstico clínico e bioquímico e oferecer o aconselhamento genético aos familiares em risco.

## HIGHLIGHTS

The genetic study of cystinuria is now available in our country.

In this first study we detected five mutations in *SLC3A1* gene and among them two are new ones.

Genotypic characterization of patients contributes to the understanding of this disease's pathophysiology, confirms the clinical and biochemical diagnosis and provides genetic counseling to relatives at risk.

(\*) (c.1597T>A ou p.Y533N) potencialmente patogénica pois resulta da substituição do nucleotido timina por adenina na posição 1597 do cDNA, o que implica que na sequência proteica seja incorporado o aminoácido 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.

(\*\*) (c.611-2A>C) foi considerada patogénica em função dos resultados obtidos nas simulações bioinformáticas e no rastreio populacional, tendo-se verificado que dá origem a um transcrito alternativo que resulta no *skipping* do exão 3 e por conseguinte numa proteína com supressão de 52 aminoácidos.

## CYSTINURIA – A REVIEW AND STUDY OF MOLECULAR BASES OF 4 PATIENTS

### ABSTRACT

**Introduction:** Classically, based on the phenotype, two types of cystinuria were identified and classified as type I and non-type I. More recently a new classification was proposed based on molecular genetics: cystinuria type A (caused by mutations on *SLC3A1* gene), type B (involving mutations on *SLC7A9* gene) and type AB if there is a digenic inheritance (*SLC3A1* and *SLC7A9*).

**Objective and methodology:** We reviewed the state of the art on the diagnosis, incidence/prevalence, biochemical classification, genetic data and treatment of cystinuria. Furthermore we characterized four patients with cystinuria at molecular level by sequencing *SLC3A1* and *SLC7A9* genes.

**Results:** On *SLC3A1* we detect five mutations, two of them (c.1597T>A and c.611-2A>C) are novel and three (c.647C>T; c.1190A>G and c.2019C>G) were been previously reported in literature. Sequencing of *SLC7A9* gene showed one (c.614\_615insA) previously published mutation. It was possible to classify three type A patients (one homozygote and two compound heterozygotes) and one patient as heterozygous type B, which is consistent with the observed urinary excretion of cystine.

**Conclusions:** Genotypic characterization of patients with cystinuria contributes to the understanding of the pathophysiology, confirms the clinical and biochemical diagnosis and provides genetic counseling to relatives at risk.

The authors underline the need of a multidisciplinary team approach in the follow-up of these patients.

**Keywords:** cystinuria, nephrolithiasis, amino acids, cystine, *SLC3A1*, *SLC7A9*.

### BIBLIOGRAFIA

1. Palacín M., Borsani G., Sebastio G. The molecular bases of cystinuria and lysinuria protein intolerance. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2001; 11:328-35.
2. 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 Inher Metab Dis*. 2008; 31:580-98.
3. 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.
4. Bröer S. Apical Transporters for Neutral Amino Acids: Physiology and Pathophysiology. *Physiology*. 2008; 23:95-103.
5. Biyani C. S., Cartledge J. Cystinuria-Diagnosis and Management. *European Association of Urology*. 2006; 175-83.
6. 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; 4:231-55.
7. 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.
8. Saudubray F., Saudubray J.M., Berghé 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, 4ª Revised Edition. 2006 ; 26:323-5.
9. Feliubadaló L., Bisceglia L., Font M., Dello Strologo L., Beccia E., mine Arslan-kirchner, et al. Recombinant Families Locate the Gene for Non-Type I Cystinuria between Markers C13 and D19S587 on Chromosome 19q13.1. *Genomics*. 1999; 60:362-5.
10. Botzenhart E., Vester U., Schmidt C., Hesse A., Halber M., Wagner C., et al. Cystinuria in children: Distribution and frequencies of mutations in the *SLC3A1* and *SLC7A9* genes. *Kidney International*. 2002; Vol. 62:1136-42.
11. Scriver CR., Clow CL., Reade TM., Goodyer P., Auray-Blais C., Giguère R., Lemieux B. Ontogeny modifies manifestations of cystinuria genes: implications for counseling. *J. Pediatric*. 1985; 106(3):411-6.
12. Calonge M. J., Volpini V., Bisceglia L., Rousaud F., Sanctis L., Beccia E., et al. Genetic heterogeneity in cystinuria: the *SLC3A1* gene is linked to type I but not to type III Cystinuria. *Genetics*. 1995; 92:9667-71.
13. Francés F., Portolés O., Corella D., Sorlí J. V., Sabater A., Carrasco P., et al. 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.
14. 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.
15. Dello Strologo L., Bras E., Pontesilli C., Beccia E., Ricci-Barbini V., Sanctis L., et al. Comparison between *SLC3A1* and *SLC7A9* Cystinuria Patients and Carriers: a Need for a New Classification. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13:2547-53.
16. Leclerc 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; 73:333-9.
17. 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. 2006; 60:737-41.
18. Jaeken J., Martens K., François I., Eyskens F., Lecointre C., Derua R., et al. Deletions of *PREPL*, a Gene Enco-

- ding a Putative Serine Oligopeptidase in Patients with Hypotonia- Cystinuria Syndrome. *The Am. J. Hum. Genetics.* 2006; 78:38-51.
19. Parvari R., Brodyansky I., Elpeleg O., Moses S., Landan D., Hershkovitz E.. A Recessive Contiguous Gene Deletion of Chromosome 2p16 Associated with Cystinuria and a Mitochondrial Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2005; 69:869-75.
20. Chabrol B., Martens K., Meulemans S., Cano A., Jaeken J., Matthijs G., et al. Deletion of *C2orf34*, *PREPL* and *SLC3A1* causes atypical cystinuria syndrome. *J. Med. Genet.* 2008; 45:314-8.
21. Ahmed K., Dasgupta P., Khan M. S. Cystine calculi: challenging group of stones. *Postgrad. Med. J.* 2006; 82:799-801.
22. Goldfarb DS., Coe FL., Asplin GR. Urinary cystine excretion and capacity in patients with cystinuria. *Kidney Int.* 2006; 69:10-41.
23. Feliubadaló L., Arbonés M.L., Mañas S., Chillarón J., Visa J., Rodés M., et al. *Slc7a9*-deficient mice develop cystinuria non-I and cystine urolithiasis. *Hum Mol Genet.* 2003; Sep 1;12; 12(17): 2097-108.
24. Font-Llitjós M., Feliubadaló L., Espino M., Clèries R., Mañas S., Frey I.M., et al. *Slc7a9* knockout mouse is a good cystinuria model for antilithiasic pharmacological studies. *Am J Renal Physiol.* 2007; 293 (3), F732-40.
25. Leclerc D., Boutros M., Suh D., Wu Q., Palacin M., Ellis J.R., Goodyer P., Rozen R. *SLC7A9* mutations in all three cystinuria subtypes. *Kidney Int.* 2002; pp.1550-9.
26. 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; 69:1198-206.
27. Jiménez-Vidal M. Transportadores Heteroméricos de Aminoácidos: Análisis Mutacional de rBAT en Cistinuria y Estudios de Relación Estructura-Función. Dissertação apresentada à Faculdade de Biologia, Universidade de Barcelona. 2005.
28. 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; 43:138-41.

## CORRESPONDÊNCIA

Altina Lopes  
Unidade de Bioquímica Genética,  
CGMJM, INSA  
Praça Pedro Nunes, 88  
4099-028 Porto  
E-mail: altina62@hotmail.com