



ARTIGO ORIGINAL

## Whole-exome sequencing as a diagnostic tool for distal renal tubular acidosis<sup>☆</sup>



Paula Cristina Barros Pereira<sup>a</sup>, Flávia Medeiros Melo<sup>a</sup>,  
Luiz Armando Cunha De Marco<sup>a,b</sup>, Eduardo Araújo Oliveira<sup>a,c</sup>,  
Débora Marques Miranda<sup>a,c</sup> e Ana Cristina Simões e Silva<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Medicina Molecular (INCT-MM), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Pediatria, Unidade de Nefrologia Pediátrica, Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

Recebido em 11 de novembro de 2014; aceito em 25 de fevereiro de 2015

### KEYWORDS

ATP6V0A4;  
ATP6V1B1;  
Children;  
Distal renal tubular  
acidosis;  
Genetics;  
Whole-exome  
sequencing

### Abstract

**Objective:** Distal renal tubular acidosis (dRTA) is characterized by metabolic acidosis due to impaired renal acid excretion. The aim of this study was to demonstrate the genetic diagnosis of four children with dRTA through use of whole-exome sequencing.

**Methods:** Two unrelated families were selected; a total of four children with dRTA and their parents, in order to perform whole-exome sequencing. Hearing was preserved in both children from the first family, but not in the second, wherein a twin pair had severe deafness. Whole-exome sequencing was performed in two pooled samples and findings were confirmed with Sanger sequencing method.

**Results:** Two mutations were identified in the ATP6V0A4 and ATP6V1B1 genes. In the first family, a novel mutation in the exon 13 of the ATP6V0A4 gene with a single nucleotide change GAC → TAC (c.1232G>T) was found, which caused a substitution of aspartic acid to tyrosine in position 411. In the second family, a homozygous recurrent mutation with one base-pair insertion (c.1149\_1155insC) in exon 12 of the ATP6V1B1 gene was detected.

**Conclusion:** These results confirm the value of whole-exome sequencing for the study of rare and complex genetic nephropathies, allowing the identification of novel and recurrent mutations. Furthermore, for the first time the application of this molecular method in renal tubular diseases has been clearly demonstrated.

© 2015 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.02.002>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Pereira PC, Melo FM, De Marco LA, Oliveira EA, Miranda DM, Simões e Silva AC. Whole-exome sequencing as a diagnostic tool for distal renal tubular acidosis. J Pediatr (Rio J). 2015;91:583–89.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [acssilva@hotmail.com](mailto:acssilva@hotmail.com) (A.C. Simões e Silva).

**PALAVRAS-CHAVE**

ATP6V0A4;  
 ATP6V1B1;  
 Crianças;  
 Acidose tubular renal  
 distal;  
 Genética;  
 Sequenciamento total  
 do exoma

## Sequenciamento total do exoma como ferramenta de diagnóstico de acidose tubular renal distal

**Resumo**

**Objetivo:** A acidose tubular renal distal (ATRD) é caracterizada por acidose metabólica devido à excreção renal de ácido prejudicada. O objetivo deste artigo é apresentar o diagnóstico genético de quatro crianças com ATRd com uso do sequenciamento total do exoma.

**Métodos:** Selecionamos duas famílias não relacionadas, quatro crianças com ATRd e seus pais, para fazer o sequenciamento total do exoma. A audição foi preservada em ambas as crianças da família um, porém em nenhuma criança da família dois, na qual um par de gêmeas teve perda auditiva severa. Fizemos o sequenciamento total do exoma em dois conjuntos de amostras e confirmamos os achados com o método de sequenciamento de Sanger.

**Resultados:** Duas mutações foram identificadas nos genes ATP6V0A4 e ATP6V1B1. Na família um, detectamos uma nova mutação no éxon 13 do gene ATP6V0A4 com uma alteração em um nucleotídeo único GAC → TAC (c.1232G>T) que causou substituição de ácido aspártico por tirosina na posição 411. Na família dois, detectamos uma mutação recorrente do homocigoto com inserção de um par de bases (c.1149\_1155insC) no éxon 12 do gene ATP6V1B1.

**Conclusão:** Nossos resultados confirmam o valor do sequenciamento total do exoma para o estudo de nefropatias genéticas complexas e permitem a identificação de mutações novas e recorrentes. Adicionalmente, demonstramos claramente pela primeira vez a aplicação desse método molecular em doenças tubulares renais.

© 2015 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

**Introdução**

A acidose tubular renal distal (ATRD) é uma doença renal rara e complexa devido a um defeito na excreção da carga de ácidos (H<sup>+</sup> e íons de amônia) em células alfa intercaladas do ducto coletor. O acúmulo da carga de ácidos no néfron distal resulta no consumo e na redução do tampão de bicarbonato/CO<sub>2</sub> no sangue.<sup>1</sup> As principais características clínicas da ATRd são vômito, diarreia e/ou constipação, perda de apetite, polidipsia e poliúria. A acidose crônica e as alterações secundárias como vômito, poliúria e desidratação afetam o crescimento e levam a um déficit de crescimento. Estudos de ultrassom podem mostrar nefrocalcinose e/ou nefrolitíase.<sup>2</sup> Em geral, a ATRd apresenta bom prognóstico caso diagnosticada precocemente e o tratamento alcalino é contínuo. Caso não tratada, a ATRd causa retardo do crescimento e raquitismo em crianças e osteomalacia em adultos. Pode ocorrer deterioração da função renal ao longo dos anos.<sup>3</sup>

A ATR distal pode ser transmitida como uma característica autossômica dominante ou recessiva.<sup>4</sup> O fenótipo autossômico dominante normalmente aparece moderadamente na adolescência ou na vida adulta;<sup>4</sup> um dos pais padece e é o portador da doença ou a doença se dá por meio de uma mutação *de novo*. Foram identificadas mutações no gene *SLC4A1* em famílias com ATRd autossômica dominante.<sup>2,5,6</sup> Os sintomas no fenótipo autossômico recessivo aparecem predominantemente na infância ou na primeira infância, quando o retardo do crescimento é muito comum. Essa variável pode ocorrer com ou sem surdez e os pais não são afetados.<sup>2</sup> A ATRd autossômica recessiva está associada a mutações em quaisquer dos seguintes genes: *SLC4A1*,<sup>7</sup> *ATP6V0A4* e *ATP6V1B1*.<sup>2,8</sup> Indivíduos sem deficiências auditivas normalmente são portadores de mutações no

gene *ATP6V0A4*, ao passo que aqueles com surdez apresentam mutações no gene *ATP6V1B1*. Em aproximadamente 20% dos pacientes com ATRd, nenhuma mutação foi encontrada em quaisquer desses genes relacionados.<sup>3</sup> De fato, existem pacientes com ATRd com surdez sem mutações no gene *ATP6V1B1* e outros com audição normal que não apresentem mutações no gene *ATP6V0A4*.<sup>3</sup> Esses achados sugerem que outros transportadores ou canais podem causar ATRd. Em termos de complexidade, sabe-se que alguns pacientes com mutações no gene *ATP6V0A4* desenvolvem surdez apenas na segunda década de vida. Portanto, há muitos fatores a serem elucidados em termos de correlações fenótipo-genótipo.<sup>8-10</sup> Até agora, já são conhecidas mais de 20 mutações no gene *ATP6V0A4*.

O sequenciamento total do exoma fornece cobertura de mais de 95% dos éxons, que contêm 85% das mutações causadoras de doenças em doenças mendelianas e muitos polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) com predisposição para doenças em todo o genoma.<sup>11,12</sup> O sequenciamento total do exoma é interessante para avaliar a patogênese da doença e reconhecer novos genes ou mutações patogênicos relacionados a doenças, principalmente às doenças mendelianas.<sup>11,12</sup> Nesse sentido, este estudo pretendeu avaliar a utilidade do sequenciamento total do exoma para o diagnóstico genético de ATRd.

**Pacientes e métodos****Avaliação individual e clínica**

Quatro crianças com ATRd confirmada de duas famílias não relacionadas foram selecionadas para este estudo. Todos os pacientes foram acompanhados na Unidade de

Nefrologia Pediátrica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. A primeira família (família um) consistia em dois irmãos afetados, uma menina e um menino, com ATRd, porém sem surdez, com pais não afetados. A segunda família (família dois) apresentava um par de gêmeas monozigóticas (duas meninas), diagnosticadas com ATRd e surdez nervosa, com mãe saudável; o pai é desconhecido. Todos os pacientes foram submetidos a um protocolo sistemático, incluindo avaliação clínica e nutricional, medições laboratoriais, ultrassonografia renal e análise genética. O consentimento informado, aprovado pelo conselho de ética institucional da UFMG, foi obtido de todos os participantes; no caso das crianças, também foi obtido de seus pais e/ou responsáveis legais.

### Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído de 5 mL de sangue periférico de pacientes com ATRd e de seus pais, com o uso do minikit Qiamp Blood DNA (Qiagen®, Milão, Itália), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras tiveram o controle de qualidade verificado com relação à pureza com o uso de um espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific®, Waltham, EUA). As amostras de DNA foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

### Sequenciamento total do exoma

O sequenciamento do exoma foi feito em dois conjuntos de amostras para aprimorar os resultados. As amostras foram divididas em conjuntos no que diz respeito às características clínicas dos pacientes. O primeiro conjunto apresentava DNA dos dois irmãos com ATRd sem surdez e o segundo, das irmãs gêmeas com ATRd relacionada à surdez. A captação do *array* foi usada para isolar os respectivos genes humanos (Seq-Cap EZ Human Exome Library v2.0, Roche®, Basileia, Suíça) e esses genes foram sequenciados na plataforma Illumina HiSeq 2000 (Sigma-Aldrich Corporation®, Missouri, EUA).

### Dados de filtragem

As principais etapas a seguir foram feitas para priorizar as variáveis de alta qualidade: (i) variáveis em regiões intergenéticas, intrônicas e não traduzidas (UTR) e mutações sinônimas foram excluídas da análise a jusante; (ii) variáveis com índice de qualidade menor do que 20 foram excluídas; (iii) somente o índice de conservação (phyloP) da comparação de humanos e 43 vertebrados acima de 3 foi considerado; (iv) após essa seleção inicial, os genes restantes foram filtrados pela função. O *software* Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) previu possíveis impactos de variáveis. O conjunto final de variáveis selecionadas passou por inspeção visual com o uso do Integrative Genomics Viewer.<sup>13</sup> Variáveis polimórficas anteriormente descritas em dados públicos foram investigadas e comparadas com as variações encontradas no exoma atual. As mutações selecionadas para investigação em cada grupo deste estudo não foram encontradas em sequenciamentos de exomas anteriores (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

### Validação de dados

O sequenciamento de Sanger da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usado na análise para confirmar os dados. Todos os pacientes e seus pais foram submetidos a PCR. Produtos de amplificação de tamanho adequado foram identificados com o uso de eletroforese em gel de poli-acrilamida. Os produtos foram purificados com o kit QIAquick PCR (Qiagen®, Milão, Itália) e então submetidos a uma reação de sequenciamento com o uso tanto de iniciadores *forward* quanto *reverse* com o ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 em um analisador genético ABI PRISM 3730XL (Applied Biosystems®, Foster City, EUA). Cada leitura foi alinhada ao sequenciamento de referência e as mutações foram identificadas com o *software* Sequencher (<http://www.genecodes.com>). Todos os iniciadores foram projetados com a ferramenta on-line Primer3. Os iniciadores do éxon 12 do gene *ATP6V1B1* foram: 5'TTGACCCCTCGGA-ATGTAGG3' e 5'CCGACCCTCTCTCCTTAC3' (tamanho do produto: 238 pares de bases). Os iniciadores do éxon 13 do gene *ATP6V1B1* foram: 5'ATGCAAATCGTGGAGCTGTG3' e 5'ATGAATCAGGGCAAGACGGT3' (tamanho do produto: 264 pares de bases).

### Estudos estruturais das mutações

Os alinhamentos de proteínas e sequências de DNA foram feitos com os *softwares* ClustalW e MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), respectivamente. A previsão da substituição de aminoácidos na função biológica da proteína foi avaliada com o uso tanto do *software* PolyPhen-2 quanto do *Provean* (<http://provean.jcvi.org> e <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, respectivamente).

## Resultados

### ATRd sem surdez

Essa família consistia em dois irmãos, uma menina de 13 anos e seu irmão de sete, com uma ATRd bem definida. A menina foi a probanda, diagnosticada com ATRd aos quatro meses. Os achados iniciais foram déficit de crescimento, acidose metabólica hiperclorêmica com pH da urina excepcionalmente alto (7,0), pH do sangue venoso normal (7,36), taxa de filtração glomerular normal e nefrocalcinose. O menino foi diagnosticado no primeiro mês de vida, após uma desidratação grave com acidose metabólica, hipocalcemia, elevação transitória da creatinina sérica e hipocalcemia. Sua primeira ultrassonografia renal mostrou nefrocalcinose bilateral. A **tabela 1** resume as manifestações clínicas e bioquímicas básicas que levaram ao diagnóstico de ATRd em cada paciente. Os pais não foram afetados e tiveram um filho mais velho que faleceu aos quatro meses com sintomas semelhantes.

O sequenciamento total do exoma feito nesse grupo gerou 3577 variantes de nucleotídeo único (SNVs) e 416 pequenas inserções e deleções (INDELS). A filtragem de variáveis foi aplicada para selecionar o gene candidato (**tabela 2**).

**Tabela 1** Achados clínicos e bioquímicos iniciais de pacientes com ATRd

Achados/Pacientes	II2 – Família 1	II3 – Família 1	II1 – Família 2	II2 – Família 2
Idade	4 meses	1 mês	2 anos	2 anos
Sexo	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino
Surdez/SNHL	Ausência	Ausência	Presença	Presença
Peso ao nascer (g)	Não disponível	3,450	2,340	2,300
Peso (g)	3,960	3,760	8,250	8,300
ZPI	< -3	0	< -3	< -3
Altura (cm)	54,5	50,0	73,5	74,0
HAZ	< -3	-2	< -3	< -3
Nefrocalcinose	Presença	Presença	Ausência	Ausência
Manifestações iniciais	Déficit de crescimento, desidratação	Vômito e desidratação	Raquitismo, déficit de crescimento, retardo do crescimento	Raquitismo, déficit de crescimento, retardo do crescimento
Creatinina sérica (mg/dL)	0,4	1,7	0,5	0,5
pH do sangue venoso	7,36	7,16	7,23	7,12
Bicarbonato sérico (mmol/L)	19,0	8,0	15,9	13,7
Potássio sérico (mEq/L)	3,8	2,0	4,0	4,1
Cloreto sérico (mmol/L)	109	118	117	123
pH da urina	7,5	7,1	7,0	7,0

Os números romanos indicam a posição da família na linhagem: II2, família 1 significa a segunda probanda (filha) da família um; II3, família 1 significa o terceiro probando (filho) da família um; II1, família 2 – a primeira filha gêmea da família dois; II2, família 2 – a segunda filha gêmea; SNHL, perda auditiva neurossensorial; ZPI, escores z de peso por idade; HAZ, escores z de altura por idade.

Após filtrar os dados do exoma, selecionamos o gene *ATP6VOA4* para estudo. Observamos uma alteração em um nucleotídeo único GAC → TAC (c.1232G > T) no éxon 13 que causou substituição de um aminoácido: ácido aspártico por tirosina na posição 411 (p.D411Y). Essa alteração no aminoácido foi preditiva de ser danosa pelo Provean e pelo PolyPhen-2. Essa mutação ocorre em um aminoácido evolutivamente conservado e afeta resíduos altamente preservados (dados não apresentados).

Os pacientes e seus pais foram submetidos ao sequenciamento de Sanger ao usar o iniciador projetado para o éxon 13 do gene *ATP6VOA4*. Os dois irmãos apresentaram a mesma mutação em homozigose (c.1232G > T), ao passo que ambos os pais apresentaram um traço heterozigótico (fig. 1A e B). Essa é uma nova mutação autossômica recessiva de ATRd.

### ATRd com surdez

Essa família consistia em um par de gêmeas com ATRd associada a surdez nervosa. As meninas foram diagnosticadas aos dois anos após um longo período de tratamento para raquitismo e retardo do crescimento somente com assistência nutricional. Características clínicas e bioquímicas no início são apresentadas na [tabela 1](#).

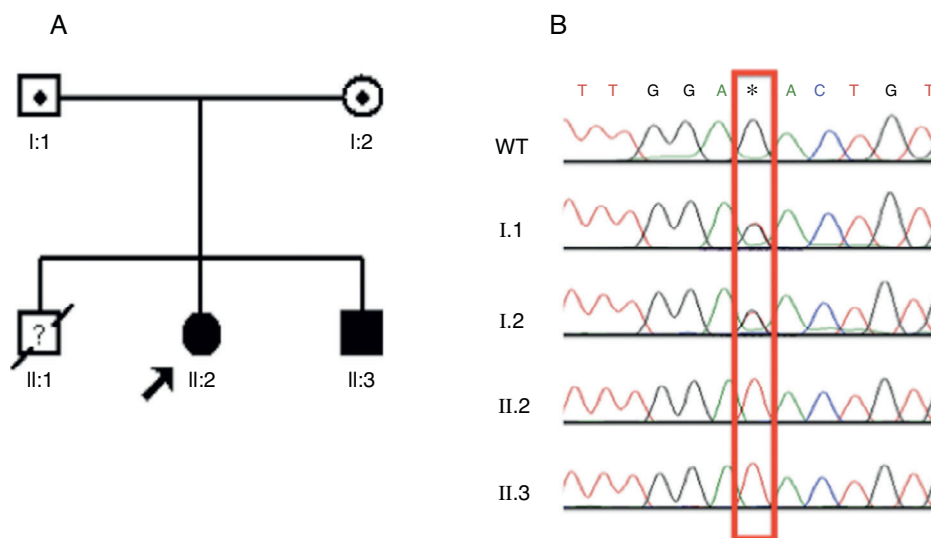
O sequenciamento total do exoma conduzido na família dois gerou 4375 SNVs e 2416 INDELS. Após filtrar as variáveis, obtivemos somente um gene candidato restante ([tabela 2](#)).

Selecionamos, com base nos dados do exoma, o gene *ATP6V1B1* como candidato nesse grupo. Uma inserção de um par de bases homozigótico (c.1149\_1155insC) no exoma 12 foi detectada (fig. 2A). As duas gêmeas com ATRd apresentaram a inserção descrita. Fizemos a PCR da mãe não afetada

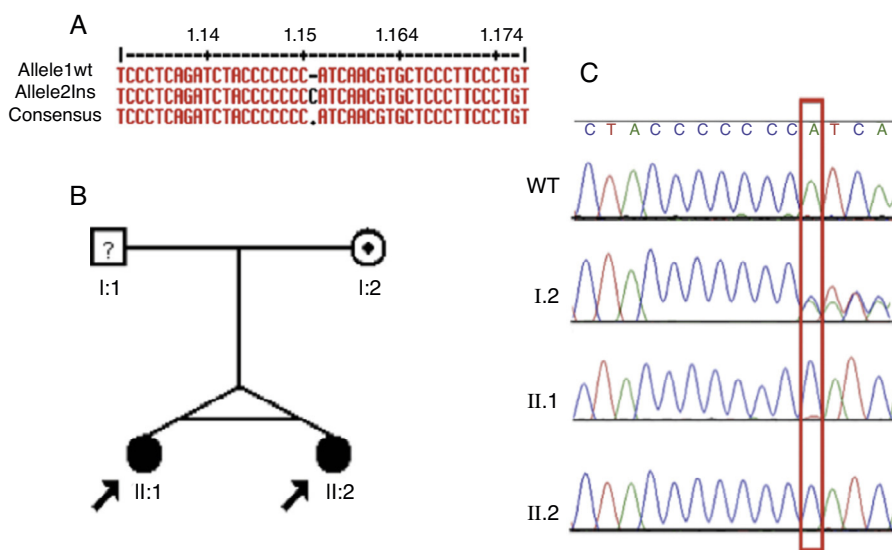
**Tabela 2** Priorização da variável para a família um e família dois

Parâmetros	Família 1 Número de variáveis	Família 2 Número de variáveis
Total de variáveis	3.993	6.791
Regiões intergênicas, intrônicas e UTR e mutações sinônimas foram excluídas	1.445	1.912
Variáveis com índice de qualidade < 20 foram excluídas	879	1.012
PhyloP < 3 foram excluídas	131	215
Seleção por função	15	14
PhyloP < 0,7 foram excluídas	10	6
Seleção com o uso da base de dados de genes com referência cruzada e o aplicativo IGV	1	1
Gene candidate	1	1

UTR, região não traduzida.



**Figura 1** Identificação, linhagem da família um e resultados de sequenciamento para mutação c.1232G > T. A) A linhagem mostra os estados afetados, identificadores individuais e genótipos no códon 411. A seta indica o probando. B) Cromatogramas do sequenciamento do DNA em que os dois irmãos afetados têm substituição do homocigoto G por T em c.1232. Essa substituição ocorre em heterocigose em ambos os pais. WT, alelo selvagem. \*Sequência nucleotídica mutada.



**Figura 2** Identificação, linhagem da família dois e resultados de sequenciamento para mutação c.1149\_1155insC. A) Identificação da mutação c.1149\_1155insC com o *software* MultAlin. B) A linhagem mostra os estados afetados, identificadores individuais e genótipos em c.1149-1155insC. A seta indica os probandos e o indivíduo com “?” tem situação do genótipo incerta. C) Cromatogramas de sequenciamento de DNA direto de membros da família em que os dois irmãos afetados têm inserção homocigótica de um C e a mãe tem um traço heterocigótico, conforme marcado pela caixa vermelha. WT, alelo selvagem.

(pai desconhecido). Os dois irmãos apresentaram a mesma mutação homocigótica, ao passo que a mãe apresentou essa inserção na heterocigose (fig. 2B e C).

## Discussão

Vários erros de DNA estão localizados em éxons e levam a alterações estruturais nas proteínas e alterações funcionais.<sup>3</sup> Dessa forma, o sequenciamento total do exoma analisa esses éxons de uma maneira rápida e com bom custo-benefício e permite avaliação genética das doenças

complexas e monogênicas.<sup>14,15</sup> Em doenças raras, o uso do sequenciamento total do exoma pode minimizar a falha na detecção de mutações em regiões críticas. Por outro lado, o sequenciamento direto de Sanger ainda é considerado o método mais preciso para encontrar mutações, uma vez que outras técnicas de teste genético, como o sequenciamento total do exoma, poderão não detectar todas as variações da sequência. A busca em todo o genoma e a validação de achados com o método de sequenciamento Sanger parecem ser uma maneira eficiente de determinar a causalidade genética de uma doença. Entretanto, a forma como essas tecnologias de última geração serão incorporadas à prática clínica



ainda é desafiadora, pois essas técnicas ainda são muito caras e a interpretação de dados é trabalhosa e difícil.<sup>11,12</sup> Estudos recentes sugerem que o sequenciamento total do exoma seria útil para avaliar a patogênese da doença e reconhecer novos genes ou mutações patogênicos relacionados a doenças, principalmente às doenças mendelianas.<sup>16</sup> Assim, no presente estudo, usamos o sequenciamento total do exoma seguido pelo sequenciamento de Sanger como uma estratégia para o diagnóstico genético de ATRd em quatro crianças.

Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, a utilidade do sequenciamento total do exoma em doenças tubulares renais e permitiram a identificação de uma mutação recorrente e uma nova mutação patogênica na ATRd. As formas herdadas de ATRd apresentam três variáveis: autossômica dominante e autossômica recessiva, com ou sem surdez.<sup>4</sup> A doença dominante normalmente se apresenta mais suavemente na adolescência ou na vida adulta e tem sido relacionada apenas a mutações no trocador bicarbonato/cloreto (AE1). Por outro lado, a variável recessiva ocorre na infância ou na primeira infância, quando o retardo do crescimento é muito comum,<sup>4</sup> conforme observado em nossos casos. A ATRd autossômica recessiva tem sido relacionada a mutações nos genes *ATP6V1B1* e *ATP6VOA4*, que codificam as subunidades  $\alpha$ 4 e B1 da ATPase de próton do tipo vacuolar (V- ou H+-ATPase), respectivamente.<sup>17-22</sup> Além disso, mutações no gene *SLC4A1*, responsável pela expressão de proteínas AE1, também foram detectadas em casos de ATRd autossômica recessiva sem surdez.<sup>23-28</sup>

De fato, mutações em diferentes subunidades da bomba de próton expressas em tecidos renais e de ouvidos podem causar defeitos tubulares relacionados à surdez.<sup>17</sup> A ATPase de próton do tipo vacuolar (V- ou H+-ATPase) é uma bomba de várias subunidades essencial para a acidificação normal. Dois domínios estruturais formam essa bomba: V0 ligado à membrana e V1 citoplasmático ou periférico. Cada domínio incluía múltiplas subunidades ( $\alpha$ -e e A-H, respectivamente), responsáveis pela hidrólise do ATP e transporte de prótons, respectivamente.<sup>4</sup> O gene *ATP6V1B1* codifica a subunidade B1, ao mesmo tempo em que o gene *ATP6VOA4* codifica a subunidade  $\alpha$ 4. O próton ATPase vacuolar é expresso apicalmente em células renais  $\alpha$  intercaladas, na cóclea e no saco endolinfático. Com base no tipo de perda auditiva, o tipo de mutações pode ser suspeito. A perda auditiva condutiva foi observada em mutações da isoforma intracelular de anidrase carbônica (AC), considerando que a perda auditiva neurosensorial (SNHL) foi associada a mutações nos genes *ATP6V1B1* e *ATP6VOA4*.<sup>18-20</sup> Dessa forma, encontramos uma inserção de um par de bases homozigótico (c.1149\_1155insC) no éxon 12 do gene *ATP6V1B1* em gêmeas com SNHL. Mutações no gene *SLC4A1* normalmente não apresentam associação com surdez.<sup>22-28</sup> Portanto, a presença e o tipo de surdez auxiliam na distinção de diferentes formas de ATRd.

Nas duas famílias deste estudo, os pais não foram afetados, a ATRd teve início precoce e levou ao impedimento do crescimento durante a infância. Portanto, as mutações no gene *SLC4A1* (proteínas AE1) foram altamente diferentes em nossos pacientes. Na família um, o sequenciamento do exoma identificou uma nova mutação homozigótica no gene *ATP6VOA4*. Com base em relatórios anteriores<sup>10</sup> e em nossas características clínicas e bioquímicas, esse gene foi

selecionado como possível candidato para buscar mutações, pois nenhuma perda auditiva foi detectada nos pacientes afetados. Observamos uma única alteração nucleotídica no éxon 13 que causou substituição de um aminoácido: ácido aspártico por tirosina na posição 411. Essa alteração no aminoácido foi preditiva de ser danosa pelo Proven e pelo PolyPhen-2. Infelizmente, não fizemos estudos funcionais para decifrar a função precisa dessa mutação. Entretanto, deve-se mencionar que essa mutação ocorre em um aminoácido conservado evolutivamente e afeta resíduos altamente preservados. Além disso, a substituição de ácido aspártico por tirosina pode alterar as propriedades químicas da proteína em regiões críticas. Por exemplo, essa alteração pode modificar o ponto isoelétrico da proteína, considerando que a tirosina é um aminoácido neutro, ao passo que o ácido aspártico é um ácido.

As gêmeas da família dois apresentaram perda auditiva neurosensorial e sintomas de início precoce de ATRd. Os fenótipos juntamente com os dados do exoma total nos levaram a investigar o gene *ATP6V1B1*. Dessa forma, constatamos uma mutação previamente descrita,<sup>9</sup> que também foi confirmada pelo sequenciamento de Sanger. Entretanto, deve-se destacar que as mutações dos genes *ATP6V1B1* ou *ATP6VOA4* não foram encontradas em algumas famílias com formas recessivas primárias de ATRd. Há vários outros genes candidatos para a ATRd recessiva,<sup>29</sup> principalmente os relacionados aos transportadores de prótons. Nesse sentido, o uso do sequenciamento total do exoma, juntamente com as características fenotípicas, pode resultar na descoberta de novas mutações e alterações genéticas nessa doença complexa e rara.

Em resumo, o sequenciamento total do exoma seguido pelo sequenciamento Sanger foi uma estratégia bem-sucedida na identificação de novas e recorrentes mutações em nossos casos de ATRd. Entretanto, as variações genéticas possíveis causadoras de alterações no transporte tubular renal, principalmente nas formas recessivas de ATRd, ainda devem ser elucidadas.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente patrocinado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Brasil, através da Concessão do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Medicina Molecular (INCT-MM): Fapemig: CBB-APQ-00075-09/CNPq 573646/2008-2. Dr. LA De Marco, Dr. EA Oliveira, Dr. DM Miranda e Dr. AC Simões e Silva receberam uma bolsa de pesquisa do CNPq.

## Referências

1. Rodríguez Soriano J. Renal tubular acidosis: the clinical entity. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2160-70.

2. Fry AC, Karet FE. Inherited renal acidoses. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:202–11.
3. Escobar L, Mejía N, Gil H, Santos F. Distal renal tubular acidosis: a hereditary disease with an inadequate urinary H<sup>+</sup> excretion. *Nefrología*. 2013;33:289–96.
4. Pereira PC, Miranda DM, Oliveira EA, Silva AC. Molecular pathophysiology of renal tubular acidosis. *Curr Genomics*. 2009;10:51–9.
5. Bruce LJ, Cope DL, Jones GK, Schofield AE, Burley M, Povey S, et al. Familial distal renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (Band 3, AE1) gene. *J Clin Invest*. 1997;100:1693–707.
6. Karet FE, Gainza FJ, Györy AZ, Unwin RJ, Wrong O, Tanner MJ, et al. Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6337–42.
7. Tanphaichitr VS, Sumboonnanonda A, Ideguchi H, Shayakul C, Brugnara C, Takao M, et al. Novel AE1 mutations in recessive distal renal tubular acidosis. Loss-of-function is rescued by glycoporphin A. *J Clin Invest*. 1998;102:2173–9.
8. Vargas-Poussou R, Houillier P, Le Pottier N, Strompf L, Loirat C, Baudouin V, et al. Genetic investigation of autosomal recessive distal renal tubular acidosis: evidence for early sensorineural hearing loss associated with mutations in the ATP6V0A4 gene. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:1437–43.
9. Karet FE, Finberg KE, Nelson RD, Nayir A, Mocan H, Sanjad SA, et al. Mutations in the gene encoding B1 subunit of H<sup>+</sup>-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet*. 1999;21:84–90.
10. Smith AN, Skaug J, Choate KA, Nayir A, Bakkaloglu A, Ozen S, et al. Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat Genet*. 2000;26:71–5.
11. Smith A, Boycott KM, Jarinova O. Lake Louise mutation detection meeting 2013: clinical translation of next-generation sequencing requires optimization of workflows and interpretation of variants. *Hum Mutat*. 2014;35:265–9.
12. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet*. 2014;59:5–15.
13. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29:24–6.
14. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:19096–101.
15. Bonnefond A, Durand E, Sand O, De Graeve F, Gallina S, Busiah K, et al. Molecular diagnosis of neonatal diabetes mellitus using next-generation sequencing of the whole exome. *PLoS ONE*. 2010;5:e13630.
16. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of Mendelian disorders. *N Engl J Med*. 2013;369:1502–11.
17. Lang F, Vallon V, Knipper M, Wangemann P. Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293:C1187–208.
18. Stover EH, Borthwick KJ, Bavalia C, Eady N, Fritz DM, Rungroj N, et al. Novel ATP6V1B1 and ATP6V0A4 mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. *J Med Genet*. 2002;39:796–803.
19. Batlle D, Haque SK. Genetic causes and mechanisms of distal renal tubular acidosis. *Nephrol Dial Transpl*. 2012;27:3691–704.
20. Gil H, Santos F, García E, Alvarez MV, Ordóñez FA, Málaga S, et al. Distal RTA with nerve deafness: clinical spectrum and mutational analysis in five children. *Pediatr Nephrol*. 2007;22:825–8.
21. Miura K, Sekine T, Takahashi K, Takita J, Harita Y, Ohki K, et al. Mutational analyses of the ATP6V1B1 and ATP6V0A4 genes in patients with primary distal renal tubular acidosis. *Nephrol Dial Transpl*. 2013;28:2123–30.
22. Elhayek D, Perez de Nanclares G, Chouchane S, Hamami S, Mlika A, Troudi M, et al. Molecular diagnosis of distal renal tubular acidosis in Tunisian patients: proposed algorithm for Northern Africa populations for the ATP6V1B1, ATP6V0A4 and SCL4A1 genes. *BMC Med Genet*. 2013;14:119.
23. Alper SL, Darman RB, Chernova MN, Dahl NK. The AE gene family of Cl/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-exchangers. *J Nephrol*. 2002;15:S41–53.
24. Schuster VL. Function and regulation of collecting duct intercalated cells. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:267–88.
25. Chang YH, Shaw CF, Jian SH, Hsieh KH, Chiou YH, Lu PJ. Compound mutations in human anion exchanger 1 are associated with complete distal renal tubular acidosis and hereditary spherocytosis. *Kidney Int*. 2009;76:774–83.
26. Alper SL. Molecular physiology and genetics of Na<sup>+</sup>-independent SLC4 anion exchangers. *J Exp Biol*. 2009;212:1672–83.
27. Cheidde L, Vieira TC, Lima PR, Saad ST, Heilberg IP. A novel mutation in the anion exchanger 1 gene is associated with familial distal renal tubular acidosis and nephrocalcinosis. *Pediatrics*. 2003;112:1361–7.
28. Wrong O, Bruce LJ, Unwin RJ, Toye AM, Tanner MJ. Band 3 mutations, distal renal tubular acidosis, and Southeast Asian ovalocytosis. *Kidney Int*. 2002;62:10–9.
29. Smith AN, Borthwick KJ, Karet FE. Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H(+)ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene*. 2002;297:169–77.