

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG
FACULDADE DE MEDICINA
TESE DE DOUTORADO

DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE DUAS FAMÍLIAS COM CASOS
DE ACIDOSE TUBULAR RENAL DISTAL POR MEIO DE
WHOLE-EXOME SEQUENCING

PAULA CRISTINA DE BARROS PEREIRA

Belo Horizonte

2014

Paula Cristina de Barros Pereira

**DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE DUAS FAMÍLIAS COM CASOS
DE ACIDOSE TUBULAR RENAL DISTAL POR MEIO DE
*WHOLE-EXOME SEQUENCING***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Área de Concentração: Medicina Molecular

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Simões e Silva
Professora Titular do Departamento de Pediatria -
Faculdade de Medicina da UFMG

Co-Orientadora: Prof. Dr^ª. Débora Marques de
Miranda

Professora Adjunta do Departamento de Pediatria -
Faculdade de Medicina da UFMG

Belo Horizonte

2014

P436d Pereira, Paula Cristina de Barros.
Diagnóstico genético de duas famílias com casos de Acidose tubular renal distal por meio de Whole-Exome Sequencing [manuscrito]. / Paula Cristina de Barros Pereira. - - Belo Horizonte: 2014.
80f.: il.
Orientador: Ana Cristina Simões e Silva.
Coorientador: Débora Marques de Miranda.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Acidose Tubular Renal/genética. 2. Transtornos do Crescimento. 3. Nefrocalcinose. 4. Adolescente. 5. Criança. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Silva, Ana Cristina Simões e. II. Miranda, Débora Marques de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: WJ 300

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a Rocksane de Carvalho Norton

Pró-reitor de Pós-graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Francisco José Penna

Vice-diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA MOLECULAR

Coordenador: Prof. Luiz Armando Cunha De Marco

Sub-coordenador: Prof. Débora Marques de Miranda

Colegiado:

Prof^a Carolina Cavaliéri Gomes

Prof. Marco Aurélio Romano Silva

Prof^a Maria Marta Sarquis Soares

Representantes Discentes:

Vitor Bortolo de Rezende

Luiz Alexandre V. Magno

AGRADECIMENTOS

À Professora **Ana Cristina Simões e Silva**, minha orientadora, pela confiança ao longo dessa jornada; grande exemplo de competência e profissionalismo.

À Professora **Débora Marques de Miranda**, minha co-orientadora, pela credibilidade e apoio a todo o tempo.

À **Flávia Melo** pela amizade, disponibilidade e imensa paciência.

À turma da bancada (em especial **Nayra, Tininha, Paty e Lu**) por toda ajuda, torcida e companheirismo.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Acidose tubular renal (ATR) distal ou ATR tipo 1 compreende um grupo heterogêneo de afecções resultantes da disfunção dos túbulos distais, que pode levar a um déficit de crescimento, nefrocalcinose, raquitismo e, raramente, doença renal crônica. Essa tubulopatia pode ser transmitida tanto na forma autossômica dominante quanto na autossômica recessiva. A forma dominante da doença ocorre tipicamente na adolescência ou na idade adulta, enquanto a variante recessiva desenvolve-se predominantemente na infância.

O objetivo deste estudo foi detectar e caracterizar as alterações genéticas presentes em duas famílias, não relacionadas, de pacientes portadores de ATR distal através da metodologia de *whole-exome sequencing* (WES). A família 1 é composta por uma menina e seu irmão que apresentavam ATR distal e audição normal, enquanto na família 2 havia duas irmãs gêmeas com ATR distal associada a surdez neurosensorial. A técnica de WES foi realizada em duas amostras agrupadas e, para confirmar os resultados, foi utilizado o método de sequenciamento de Sanger. Duas mutações foram identificadas nos genes *ATP6V0A4* e *ATP6V1B1*: uma mutação nova no exon 13 do gene *ATP6V0A4* (c.1232G>T) e uma mutação no exon 12 do gene *ATP6V1B1* que já foi previamente descrita na literatura (c.1149_1152insC).

Nosso estudo indica que os resultados obtidos com o *whole-exome sequencing* podem ser úteis para o diagnóstico e a abordagem clínica de pacientes com ATR distal, especialmente porque, além de ser uma doença Mendeliana, é rara e com herança complexa.

Nossos resultados confirmaram o valor do *whole-exome sequencing* para o estudo de doenças raras e complexas, permitindo a identificação de mutações novas e recorrentes. Além disso, nosso estudo mostra a aplicabilidade deste método molecular no estudo de doenças renais tubulares.

Palavras-chave: Acidose tubular renal distal. Whole-exome sequencing. Infância. *ATP6V0A4*. *ATP6V1B1*

ABSTRACT

Distal renal tubular acidosis (dRTA) refers to a heterogeneous group of diseases that result from distal tubular dysfunction and can lead to growth retardation, nephrocalcinosis, bone disease and, rarely, chronic kidney disease. dRTA can be transmitted as either an autosomal dominant or an autosomal recessive trait. Dominant disease typically presents more mildly in adolescence or adulthood and the recessive variant, predominantly developed in infancy/early childhood.

The aim of this study was to detect genetic alterations in two unrelated families with dRTA using whole-exome sequencing. Hearing was normally preserved in both children from family one, but not from family two, where a twin pair had severe deaf. We perform a whole-exome sequencing in two pooled samples and confirm findings with Sanger sequencing method. Two mutations were identified in the *ATP6V0A4* and *ATP6V1B1* genes: a novel mutation in exon 13 of *ATP6V0A4* gene (c.1232G>T) and a mutation in exon 12 of *ATP6V1B1* gene (c.1149_1152insC) previously described.

The findings obtained with whole-exome sequencing may improve health care, especially because, besides of being a Mendelian disorder, dRTA is rare and has a complex inheritance.

Our results confirm the value of whole-exome sequencing for the study of rare and complex diseases, allowing the identification of novel and recurrent mutations. Furthermore, we clearly show the application of this molecular method in renal tubular diseases.

Key words: Distal renal tubular acidosis. Whole-exome. Children. *ATP6V0A4*. *ATP6V1B1*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE1 = trocador aniônico cloro-bicarbonato

ATR = acidose tubular renal

ACII = anidrase carbônica tipo 2

ACIV = anidrase carbônica tipo 4

COEP = comitê de ética em pesquisa

eAE1 = trocador aniônico cloro-bicarbonato eritrocitário

H⁺ATPase = bomba de prótons

kAE1 = trocador aniônico cloro-bicarbonato renal

ND = nefron distal

TC = túbulo coletor

TCN = túbulo conector

TD = túbulo distal

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

UNP-HC = Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas

WES = whole-exome sequencing

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Figura esquemática da H⁺ ATPase renal com suas subunidades: o domínio V1 (A-H) e o domínio V0 (a, c, c', c'', d)..... 15
- Figura 2.** Mecanismos de transporte tubular no néfron distal: (A) secreção de íons hidrogênio e acidificação urinária; (B) reabsorção de bicarbonato..... 19
- Figura 3.** Pedigrees das famílias do estudo. A) Pedigree da família 1. B) Pedigree da família 2. A seta indica o caso índice..... 37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Primers para amplificação genômica e análise de mutações para os genes *ATP6V1B1* e *ATP6V0A4*..... 41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Acidose Tubular Renal.....	12
1.2	Acidose Tubular Renal Distal.....	13
1.2.1	Etiologia e genética.....	14
1.2.2	Fisiopatologia.....	18
1.2.3	Diagnóstico.....	21
1.2.4	Tratamento	23
1.3	Justificativa do estudo.....	24
2	REVISÃO DE LITERATURA (ARTIGO 1).....	26
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo Geral.....	36
3.2	Objetivos Específicos.....	36
4	PACIENTES E MÉTODOS.....	37
4.1	Pacientes.....	37
4.2	Metodologia.....	38
4.2.1	Coleta de sangue periferico e extração de DNA	38
4.2.2	Sequenciamento por Genoma Inteiro (Whole-exome Sequencing - WES)	38
4.2.3	Análise do Sequenciamento por WES.....	39
4.2.4	Estudo estrutural das alterações encontradas	40
4.2.5	Validação dos Resultados: amplificação e sequenciamento das amostras	40
4.3	Aspectos Éticos	42
5	RESULTADOS: ANÁLISE GENÉTICA (ARTIGO 2).....	43
6	CONCLUSÃO.....	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8	ANEXOS.....	70
8.1	Parecer do COEP (comitê de ética em pesquisa)/ UFMG	70
8.2	Ata de defesa.....	71

8.3	Declaração de aprovação.....	72
8.4	Artigo Original.....	73

1 INTRODUÇÃO

Apesar de não apresentar incidência tão elevada em nosso meio quanto outras nefropatias, como as doenças glomerulares e urológicas, a acidose tubular renal (ATR) assume grande importância, não apenas pela dificuldade diagnóstica, mas também pelo grande impacto sobre o crescimento pômbero-estatural das crianças acometidas (1-5). O seguimento clínico, os exames complementares e o tratamento dos pacientes portadores de ATR já se encontram bem estabelecidos em nosso meio (6). No entanto, não há nenhum estudo genético com pacientes brasileiros até o momento. Neste contexto, a presente tese pretende estender e ampliar o conhecimento sobre as doenças tubulares renais em crianças e adolescentes brasileiros, focando mais especificamente na caracterização genotípica dos portadores de ATR distal ou tipo 1 e da correlação desses achados com o fenótipo dos pacientes.

1.1 Acidose Tubular Renal

O termo Acidose Tubular Renal (ATR) engloba diversas afecções caracterizadas por acidose metabólica secundária a um defeito na reabsorção tubular renal de bicarbonato (HCO_3^-) e/ou na excreção urinária de íons hidrogênio (H^+), enquanto a função glomerular é nada ou minimamente afetada (6). Todas as formas de ATR apresentam acidose metabólica hiperclorêmica, com intervalo aniônico normal. São doenças crônicas com impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes quando não tratadas adequadamente, podendo evoluir com déficit do crescimento, osteoporose, raquitismo, nefrolitíase e até perda da função renal (7). Podem ser primárias, decorrentes de defeitos genéticos nos mecanismos de transporte dos túbulos renais, ou secundárias a doenças sistêmicas ou ao efeito adverso de medicamentos (5,6).

Os rins são responsáveis pela reabsorção do HCO_3^- filtrado e excreção de H^+ numa quantidade igual àquela produzida pelo metabolismo diário de proteínas. A resposta normal a acidemia consiste na reabsorção do HCO_3^- filtrado e aumento da excreção de ácidos, principalmente através da maior excreção de íons amônio (NH_4^+) na urina. Assim, para cada H^+ excretado há regeneração de um íon HCO_3^- no plasma (7-9).

As ATR são classificadas em quatro categorias: ATR distal ou tipo 1; ATR proximal ou tipo 2 e ATR hipercalêmica ou tipo 4. A ATR mista ou tipo 3 é caracterizada por uma desordem que apresenta características mistas dos tipos 1 e 2 (5).

A seguir, será brevemente descrito a ATR distal ou tipo 1 em relação às características clínicas, fisiopatologia, etiologia e genética, diagnóstico e tratamento.

1.2 Acidose Tubular Renal Distal

A ATR distal caracteriza-se por uma inabilidade dos túbulos distal e coletor em promover uma adequada acidificação urinária, resultando numa urina com pH elevado, mesmo em presença de acidose metabólica (5). Inicialmente, a função glomerular encontra-se normal ou perto do valor normal em todos os casos (7).

Em relação ao quadro clínico, observam-se déficit de crescimento, poliúria, hipercalciúria, nefrocalcinose e nefrolitíase. Ao diagnóstico, grande parte dos pacientes apresenta-se com baixa estatura e baixo peso (4,10-14). O retardo do crescimento aparece como queixa principal em quase todos os estudos realizados até o momento. Dentre os sintomas clínicos, vômitos e poliúria encontram-se entre os mais prevalentes. A nefrocalcinose, presente em cerca de 50% dos pacientes ao diagnóstico (1,4,13), pode progredir para insuficiência renal crônica. Na ATR distal diagnosticada precocemente a instituição do tratamento com álcalis pode promover a retomada da curva de crescimento, impedir ou retardar o desenvolvimento da nefrocalcinose e preservar a função renal.

1.2.1 *Etiologia e genética*

A ATR distal pode ser primária, devido a defeitos genéticos nos mecanismos de transporte, ou secundária a uma variedade de doenças (7,15). Dentre as formas primárias podemos encontrar as seguintes variantes: autossômica dominante e autossômica recessiva com ou sem surdez. Na criança, o defeito é, na maioria das vezes, primário (5). Em algumas famílias, a presença da doença em várias gerações sugere uma forma autossômica dominante. Apesar das manifestações clínicas não serem diferentes das observadas nas formas autossômicas recessivas, estes pacientes podem ter seu diagnóstico mais tardio e evoluírem com sintomatologia mais branda (16). Já pacientes com a forma autossômica recessiva geralmente apresentam manifestações clínicas mais acentuadas com importante déficit de crescimento e nefrocalcinose precoce, podendo evoluir para insuficiência renal (9). Os achados clínicos dos pacientes autossômicos recessivos acompanhados de surdez neurosensorial são idênticos aos dos pacientes portadores de ATR distal autossômica recessiva com audição normal (17). A evolução da surdez é progressiva e não há melhora, mesmo após terapia com álcalis (18). A ATR distal, autossômica recessiva, com função auditiva normal é a forma primária mais comumente encontrada (19).

Dentre as causas secundárias, que são mais comuns em pacientes adultos do que pediátricos, incluem-se (20,21):

- 1 -doenças auto-imunes: síndrome de Sjögren, hepatite crônica ativa, tireoidite, poliarterite nodosa, hiperparatireoidismo primário, rim esponjoso medular, doença de Wilson, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico;
- 2 -uso de medicamentos: anfotericina B, sulfametoxazol-trimetoprim, amilorida, lítio, analgésicos;
- 3 -exposição ao tolueno (cheiradores de cola) e ao mercúrio;
- 4 -doenças túbulo-intersticiais: uropatia obstrutiva, pielonefrite crônica, transplante renal;
- 5 -doenças genéticas: Síndrome de Ehlers-Danlos.

H⁺ ATPase

As H⁺ATPases ou V-ATPases (vacuolar) são bombas de prótons essenciais para o funcionamento de diversos compartimentos intracelulares em organismos eucariotas (figura 1). São encontradas em grande quantidade na membrana plasmática de células especializadas como as células intercaladas renais, osteoclastos, células do trato genital masculino e da orelha interna (22).

A H⁺ATPase renal, localizada na membrana apical das células intercaladas tipo α dos tubulos coletor e distal, é a principal bomba de prótons responsável pela acidificação urinária. É uma proteína de membrana com múltiplas subunidades divididas em dois domínios funcionais: V1, complexo citoplasmático responsável pela hidrólise do ATP e V0, complexo transmembrana responsável pela translocação do próton. Algumas subunidades possuem isoformas diferentes de acordo com a espécie onde é expressa (22-24).

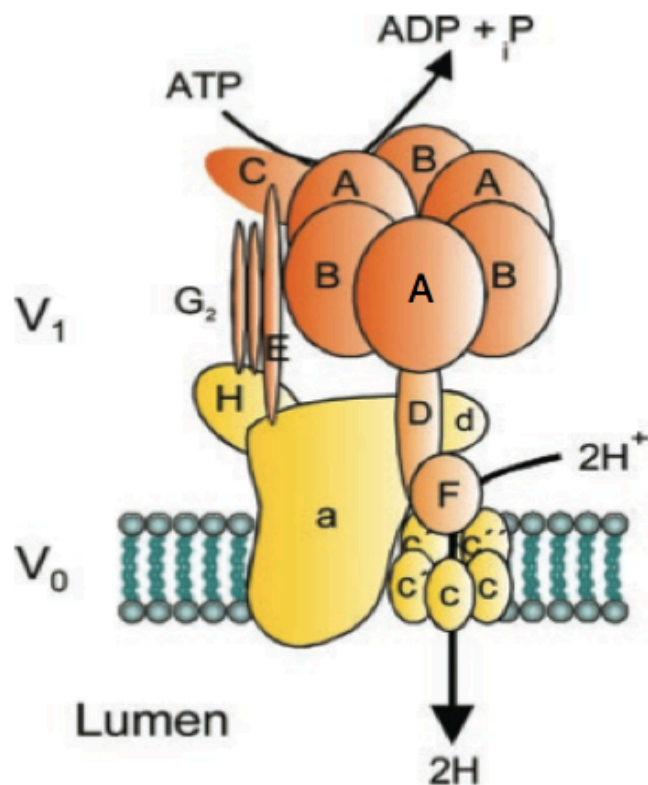


Figura 1. Figura esquemática da H⁺ ATPase renal com suas subunidades: o domínio V1 (A-H) e o domínio V0 (a, c, c', c'', d) (22).

O domínio V1 (periférico; 570-kDa) é composto por 8 diferentes subunidades (A-H), sendo 3 cópias das unidades A e B, 2 cópias da unidade G e uma única cópia das demais. Já o domínio V0 (transmembrana; 260-kDa) é composto por 5 subunidades (a, c, c', c'', d), sendo seis cópias das unidades c/c' e uma cópia das demais (22).

Gene *SLC4A1*

O gene *SLC4A1* ou AE1 (*Solute Carrier Family 4, Anion Exchanger, Member 1*) pertence a uma família de genes trocadores de ânions "Anion Exchanger-AE gene family". Era comumente chamado de *AE1 (anion exchanger 1 gene)*, porém, foi recentemente renomeado como *SLC4A1*, pelo comitê de nomenclatura do mapeamento genético humano (*Human Gene Mapping - HGM*). É composto de 20 *exons* e 19 *introns* estando localizado no cromossomo 17q12-q21 e constituído de 17 kb no total (25).

O gene é composto de duas regiões promotoras tecido-específicas, uma eritróide localizada acima do *exon 1* e uma interna localizada no *intron 3*, no caso das células renais (26). Codifica a proteína transportadora de íons ou trocador aniônico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE1 ou banda 3) nas sua duas isoformas eAE1 (eritrocitária) e rAE1 (renal). Diferem quanto a sua transcrição: o RNA mensageiro (mRNA) da rAE1 não apresenta os três primeiros exons observados na forma eritróide (27). Nos rins, a proteína é expressa na membrana basolateral de células α intercaladas do tubulo coletor, onde é responsável pela reabsorção de HCO_3^- , compensando a secreção de ácidos pela H^+ ATPase vacuolar apical, e participando da regulação fina do equilíbrio ácido-básico (15).

Mutações no gene *SLC4A1* podem resultar em duas doenças distintas e independentes: anormalidades nos glóbulos vermelhos (esferocitose hereditária e ovalocitose) e ATR distal. Várias mutações que resultam em ATR distal já foram descritas tanto na forma autossômica dominante quanto na recessiva (28,29). A alteração dominante predomina em indivíduos brancos com doença caracterizada

por acidose metabólica hiperclorêmica, hipocalcemia variável, retardo do crescimento infantil, nefrocalcinose e nefrolitíase, que progride para insuficiência renal. A doença recessiva, frequentemente, se manifesta cedo acompanhada por uma concentração urinária deficiente e suscetibilidade a desidratação grave. Recentemente, foi descrita uma mutação em 3 irmãos indianos causando ATR distal associada a esferocitose heteritária (30). Ressalta-se ainda que mutações trocador AE1 já foram descritas em crianças do nosso meio, portadoras de ATR distal e nefrocalcinose (31,32).

Gene *ATP6V1B1*

O gene *ATP6V1B1*, localizado no cromossomo 2q13 e composto por 14 exons, codifica a subunidade B1 da H⁺ATPase, presente na membrana apical das células intercaladas tipo α e também na cóclea e no saco endolinfático (15,33).

Mutações nesse gene já foram detectadas em pacientes portadores de ATR distal autossômica recessiva associada à surdez neurosensorial (34-36). Demonstrou-se que as células auditivas interdentes e as células do saco endolinfático são muito semelhantes às células intercaladas do tipo α , apresentando tanto a H⁺ATPase como o trocador AE1. Assim, uma secreção normal de ácidos por estas células é fundamental para a manutenção de um pH reduzido na endolinfa e uma função auditiva normal (15,16). Considerando que a alta concentração de potássio presente nesse compartimento fechado não é normalmente acompanhada por alcalinidade da endolinfa, propõe-se que a H⁺ATPase atue na manutenção do pH em aproximadamente 7,4. A perda de tal função leva ao aumento do pH, promovendo dano celular e perda auditiva (37).

Gene *ATP6V0A4*

O gene *ATP6V0A4* está localizado no cromossomo 7q33-34 e é composto por 22 exons, dos quais 20 codificam a subunidade α da H^+ ATPase.

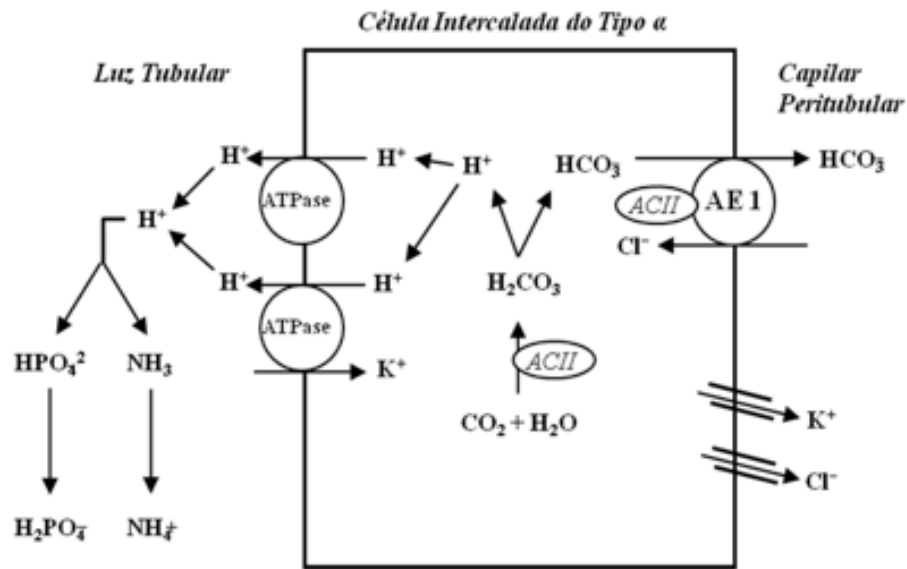
A ATR distal com perda auditiva neurosensorial predomina nas mutações do gene *ATP6V0A4*, enquanto a ATR distal com ausência de anormalidade auditiva (pelo menos na infância) se relaciona com alterações no gene *ATP6V0A4*. Contudo, neste último, a surdez pode se desenvolver com idade mais avançada, após a segunda década de vida, embora seja menos grave na maioria dos casos (5). O fato de esse gene ser também expresso em células do ouvido interno pode explicar o desenvolvimento da surdez (15,38).

1.2.2 Fisiopatologia

No néfron distal (ND), são definidas as características finais da urina através dos mecanismos de concentração e acidificação urinárias, secreção de K^+ e conservação do Na^+ . O ND é formado pelos seguintes segmentos: túbulo distal (TD), túbulo conector (TCN) e túbulo coletor (TC) (6). O TD é responsável pela reabsorção de 5% do Na^+ filtrado enquanto o TC é responsável pela reabsorção de 2% a 3% do cloreto de sódio ($NaCl$) filtrado.

Esse segmento apresenta dois tipos de células com funções e morfologia bastante diferentes: células principais ou células claras, onde ocorre reabsorção de sódio (Na^+) e é o principal sítio para secreção de potássio (K^+), e células intercaladas ou células escuras, que estão relacionadas ao equilíbrio ácido-básico, sendo responsáveis pela maior ou menor acidificação urinária (8,39). As células intercaladas do tipo α (figura 2) expressam H^+ ATPase na membrana apical, e o trocador AE1, em sua membrana basolateral. Através da ação da H^+ ATPase ocorre secreção de íons H^+ para o lúmen tubular e reabsorção de HCO^- para o interstício.

(A)



(B)

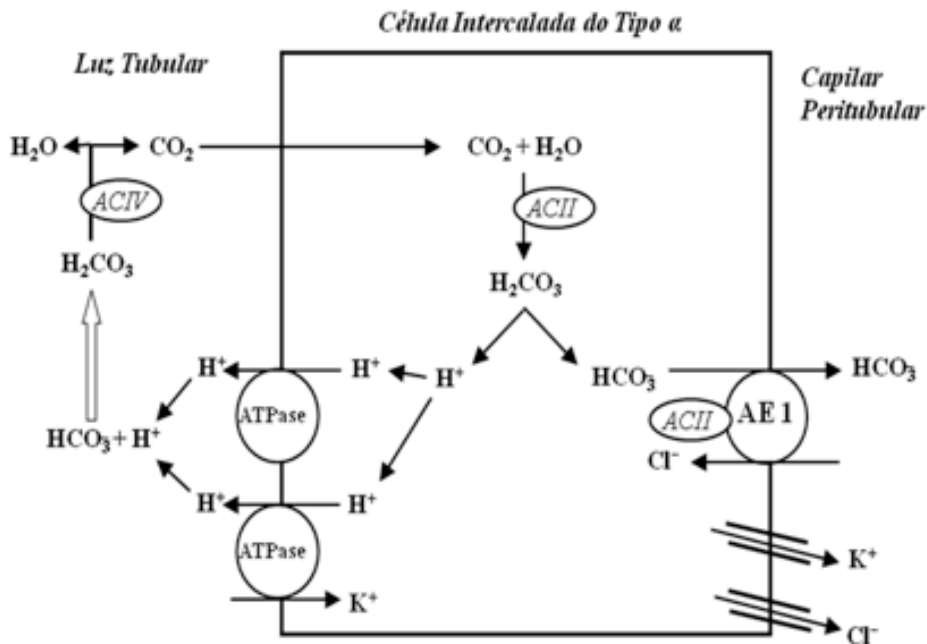


Figura 2. Mecanismos de transporte tubular no néfron distal: (A) secreção de íons hidrogênio e acidificação urinária; (B) reabsorção de bicarbonato.

ACII (anidrase carbônica tipo 2) e ACIV (anidrase carbônica tipo 4).

A ATR distal pode resultar dos seguintes defeitos nos túbulos distais: diminuição da atividade da H⁺ATPase (ATR distal secretora); aumento da permeabilidade da membrana luminal (ATR distal por difusão retrógrada) ou diminuição da reabsorção distal de Na⁺ (ATR distal voltagem dependente) (40).

A diminuição, ou mesmo ausência, de atividade da H⁺ATPase das células intercaladas dos túbulos distais e coletores, geralmente é secundária a um defeito genético. Também já foram detectadas mutações no trocador AE1 que, assim como a H⁺ATPase, participa do processo de acidificação urinária, reabsorvendo HCO₃⁻. Outra possibilidade para explicar esse sub-tipo da ATR distal seria a existência de um defeito na H⁺/K⁺ATPase, localizada na membrana apical das células intercaladas. No entanto, alguns autores acreditam que esta bomba esteja mais relacionada à homeostase do K⁺ que do H⁺ (5).

O modelo de Stewart (18) é uma forma alternativa de entendimento dos distúrbios ácido-básicos, que se baseia nas leis de conservação de massa e carga. Levando-se em conta que o plasma é formado por íons totalmente dissociados (íons “fortes” tais como Na⁺, K⁺, Cl⁻, lactato), ácidos “fracos” parcialmente dissociados (albumina e fosfato) e tampões voláteis (espécies carbonadas), Stewart elaborou uma equação polinomial que relaciona a concentração de H⁺ com três variáveis independentes: a diferença entre os íons “fortes”, a concentração total de ácidos fracos e a pressão parcial de gás carbônico (CO₂) (18). Dessa forma, o modelo de Stewart avalia as acidoses metabólicas através de mudanças nas concentrações de íons considerados “fortes” aferidas pela seguinte operação matemática: [Na⁺]+[K⁺]-[Cl⁻]. Segundo essa nova visão, acredita-se que a ATR seja devida primariamente a um defeito nas proteínas de transporte do íon H⁺ que acarretam, secundariamente, em alterações no transporte do cloro (Cl⁻). Tais alterações no transporte de Cl⁻ reduzem a diferença entre os íons “fortes”, resultando em acidose metabólica. Este modelo considera que as alterações na excreção do bicarbonato são apenas um epifenômeno, decorrente das mudanças na excreção urinárias dos íons “fortes” (33). Esta nova visão dos distúrbios ácido-básicos permite um melhor entendimento dos achados clínicos e laboratoriais em alguns tipos de ATR distal

como as decorrentes de mutações do trocador AE1, assim como explica a piora da acidose nesses pacientes, induzida por uma carga excessiva de NaCl 0,45% (19).

O exemplo clássico de ATR distal, causada por aumento da permeabilidade da membrana luminal do ND, está associado ao uso de anfotericina B. Postulava-se, inicialmente, que esta droga formaria canais aquosos na membrana das células do TD e promoveria o retorno de íons H^+ para o interior da célula. Este processo foi chamado de difusão retrógrada. Entretanto, esta teoria tem sido questionada. Alguns autores acreditam que o H_2CO_3 e/ou o HCO_3^- , e não o H^+ , possam retornar para a luz tubular (40). O relato de crianças com quadros de ATR distal associada a doenças auto-imunes sugere que o mecanismo de difusão retrógrada como causa ainda não foi totalmente esclarecido (41).

A reabsorção de Na^+ no TC cria uma diferença de potencial lúmen- negativa, que é fundamental para a secreção de íons H^+ e K^+ (8). Os fatores relacionados à diminuição da reabsorção de Na^+ ou de seu aporte ao TD, podem reduzir a capacidade secretora deste segmento do néfron, que é voltagem dependente (40). Os fatores mais comumente relacionados a este tipo de ATR são a uropatia obstrutiva, a depleção volumétrica e o uso de diuréticos poupadores de K^+ (42). Como a secreção de K^+ está igualmente comprometida, também pode evoluir com elevação dos níveis séricos deste cátion (40). Recentemente, entretanto, a teoria de que a ATR distal hipercalêmica seja causada por defeito isolado de uma diferença de potencial transmembrana tem sido questionada. Alguns estudos têm demonstrado que os mecanismos envolvidos são bem mais complexos, envolvendo também defeitos no funcionamento da $H^+ATPase$, $H^+/K^+ATPase$ e $Na^+/K^+ATPase$ (42).

1.2.3 *Diagnóstico*

O diagnóstico de ATR distal deve ser suspeitado em presença de acidose metabólica hiperclorêmica acompanhada de *anion gap* urinário positivo, ou seja, de uma concentração de Cl^- na urina inferior à soma das concentrações de sódio e potássio. Nessas circunstâncias, se a concentração plasmática de potássio é normal

ou está reduzida, e o paciente é incapaz de reduzir o pH urinário para valores inferiores a 5,5, estabelece-se o diagnóstico de ATR distal. A excreção urinária de citrato geralmente está diminuída, devido a sua maior reabsorção proximal, estimulada pela acidose. A excreção urinária aumentada de cálcio (Ca^{2+}) associada a hipocitratúria e ao pH urinário persistentemente elevado, pode contribuir para o desenvolvimento de nefrolitíase e nefrocalcinose. Tais alterações são comuns na ATR distal não tratada, embora existam relatos de nefrocalcinose na ausência de hipercalciúria (43).

O raquitismo e a diminuição da massa óssea também podem ser encontrados, mas sua real incidência ainda é incerta. A acidose metabólica também pode, por si só, alterar o metabolismo da vitamina D, diminuindo sua produção renal, com conseqüente déficit na reabsorção intestinal de Ca^{2+} e doença óssea secundária.

A hipocalcemia está presente em 30 a 50% dos casos. Pode manifestar-se como fraqueza muscular, às vezes com episódios agudos de paralisia flácida, que podem evoluir para tetraplegia em até 48h (44).

A apresentação clínica da ATR distal engloba, além do déficit de crescimento nas crianças, um quadro de anorexia, vômitos e poliúria (45). Algumas condições podem mimetizar a ATR distal com pH urinário maior que 5,5. Pacientes portadores de infecção urinária por bactérias urease-positivas podem apresentar pH urinário alcalino, porém, em geral, não apresentam acidose sistêmica. Além disso, o exame microbiológico e o sedimento urinário exibem alterações típicas. A fase inicial da ATR proximal, quando ainda há perda urinária de álcalis e hipovolemia, também pode confundir-se com a ATR distal. A depleção de K^+ e o aumento da excreção urinária de amônia (NH_3), que podem ocorrer na acidose metabólica por diarreia aguda, simulam, algumas vezes, o quadro laboratorial desta patologia (5).

É importante ressaltar ainda que existem formas incompletas de ATR distal que dificultam o diagnóstico, pois, muitas vezes, os pacientes apresentam-se com pH sanguíneo normal e pH urinário apenas levemente aumentado. Nesses casos, pode ser necessária a utilização de provas de acidificação urinária por meio da administração oral de cloreto de amônio (NH_4Cl), em pó ou em cápsula, na dose de 0,1 grama/Kg. Recomenda-se que seja coletada a urina a cada hora, nas próximas 8

horas; e a gasometria seja realizada no início do teste e a cada hora, nas 4 horas subseqüentes à administração do ácido. Se o pH urinário falha em cair abaixo de 5,5 durante a quarta hora após o NH_4Cl , é provável que a ATR distal esteja presente, desde que um pH sangüíneo inferior a 7,35 e um bicarbonato menor que 20 mEq/L sejam documentados (6).

1.2.4 Tratamento

O objetivo do tratamento consiste não só na correção das alterações bioquímicas, mas principalmente na retomada do crescimento e na prevenção da nefrocalcinose e da insuficiência renal. Os pacientes adequadamente tratados geralmente são assintomáticos e podem levar uma vida normal, a não ser que já tenha havido lesão renal ou óssea irreversíveis (5). A normalização do pH sérico diminui a perda urinária de K^+ e previne a litíase e o desenvolvimento da nefrocalcinose (46). A correção da acidose também reverte as alterações no metabolismo das células ósseas, aumentando, conseqüentemente, a densidade mineral do osso (47).

A base do tratamento constitui na administração de doses contínuas e adequadas de álcalis, sob a forma de HCO_3^- ou citrato. A quantidade ofertada deve ser suficiente para suprir as perdas urinárias de HCO_3^- além da demanda diária gerada pela contínua produção de ácidos pelo organismo, secundária ao catabolismo protéico. Em pacientes mais jovens, podem ser necessários de 4 a 14 mEq/Kg de bicarbonato de sódio, que deve ser oferecido em doses fracionadas (5,45). Crianças maiores e adultos, em geral, necessitam de doses menores. O citrato de potássio também pode ser utilizado em doses de 4 mEq/Kg/dia. A dose de álcalis é considerada adequada quando é suficiente para corrigir a maioria das anormalidades urinárias, inclusive a hiper calciúria. Deve-se evitar o uso de doses excessivas de álcalis, que podem elevar excessivamente o pH urinário, propiciando a precipitação do cálcio excretado em excesso. Recomenda-se, então, evitar que o pH urinário torne-se superior a 8,0. Idealmente, o pH urinário deve ser mantido entre

6,5 e 7,5 e a gasometria revelar equilíbrio ácido básico. A monitoração individual é fundamental para o ajuste das doses (48).

A correção da hipercalcúria é mandatória, mesmo em presença de uma excreção urinária adequada de citrato. O citrato pode melhorar a saturação urinária para o oxalato de cálcio, mas não reverte a tendência para a saturação renal do fosfato de cálcio no osso (48). A monitoração do Ca^{2+} urinário, através da relação cálcio/creatinina em amostra de urina e/ou dos níveis de cálcio na urina de 24 horas é importante para a avaliação do tratamento (49). O uso de diuréticos tiazídicos é uma opção terapêutica para controlar a hipercalcúria, quando a excreção urinária de cálcio persiste aumentada mesmo após correção do distúrbio ácido-básico (50).

Pacientes portadores de ATR distal primária vão requerer tratamento prolongado, possivelmente por toda a vida. Em geral o prognóstico é excelente, sobretudo para as crianças precoce e adequadamente tratadas. O uso adequado da terapia alcalina pode restabelecer o crescimento e prevenir a progressão para nefrocalcinose (5).

1.3 Justificativa do estudo

A técnica do *whole-exome sequencing* (WES) consiste no sequenciamento completo dos éxons, ou exoma. Os éxons são a parte do genoma que contém as informações para a produção das proteínas vitais para o funcionamento do organismo. Apesar de constituir apenas 1% de todo genoma, a maioria das mutações causadoras de doenças está localizada nessa região (85% de todas as variações consideradas de grande risco para as doenças comuns). Dessa maneira, o WES tem-se mostrado muito útil para identificar mutações novas e recorrentes, especialmente em doenças raras, complexas e de herança Mendeliana (51,52).

Dentro desse contexto, hipotetizamos que a técnica de WES poderia ser útil para o diagnóstico genético da ATR distal, por se tratar de doença complexa e heterogênea em relação às alterações genéticas subjacentes e à correlação entre

genótipo e fenótipo dos pacientes. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a aplicabilidade da técnica de WES no diagnóstico genético desta tubulopatia. Ressalta-se ainda que se trata do primeiro estudo em que a técnica de WES foi aplicada para diagnóstico de uma tubulopatia.

2 REVISÃO DE LITERATURA (ARTIGO 1)

Molecular Pathophysiology of Renal Tubular Acidosis

(Current Genomics, 2009, Vol. 10, No. 1, 51-59)

Molecular Pathophysiology of Renal Tubular Acidosis

P.C.B. Pereira, D.M. Miranda, E.A. Oliveira* and A.C. Simões e Silva

Pediatric Nephrology Unit, Department of Pediatrics, School of Medicine – Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

Abstract: Renal tubular acidosis (RTA) is characterized by metabolic acidosis due to renal impaired acid excretion. Hyperchloremic acidosis with normal anion gap and normal or minimally affected glomerular filtration rate defines this disorder. RTA can also present with hypokalemia, medullary nephrocalcinosis and nephrolithiasis, as well as growth retardation and rickets in children, or short stature and osteomalacia in adults. In the past decade, remarkable progress has been made in our understanding of the molecular pathogenesis of RTA and the fundamental molecular physiology of renal tubular transport processes. This review summarizes hereditary diseases caused by mutations in genes encoding transporter or channel proteins operating along the renal tubule. Review of the molecular basis of hereditary tubulopathies reveals various loss-of-function or gain-of-function mutations in genes encoding cotransporter, exchanger, or channel proteins, which are located in the luminal, basolateral, or endosomal membranes of the tubular cell or in paracellular tight junctions. These gene mutations result in a variety of functional defects in transporter/channel proteins, including decreased activity, impaired gating, defective trafficking, impaired endocytosis and degradation, or defective assembly of channel subunits. Further molecular studies of inherited tubular transport disorders may shed more light on the molecular pathophysiology of these diseases and may significantly improve our understanding of the mechanisms underlying renal salt homeostasis, urinary mineral excretion, and blood pressure regulation in health and disease. The identification of the molecular defects in inherited tubulopathies may provide a basis for future design of targeted therapeutic interventions and, possibly, strategies for gene therapy of these complex disorders.

Received on: October 9, 2008 - Revised on: November 8, 2008 - Accepted on: November 12, 2008

Key Words: Renal tubular acidosis, acid-base homeostasis, molecular physiology, tubular transport, gene mutations.

INTRODUCTION

The term Renal Tubular Acidosis (RTA) defines many disorders characterized by metabolic acidosis, secondary to defects in renal tubular reabsorption of bicarbonate (HCO_3^-) and/or in urinary excretion of hydrogen (H^+), while glomerular function is little or not affected [1-6]. All forms of RTA present hyperchloremic metabolic acidosis, with normal anion gap and are chronic diseases with significant impact on the quality of life of affected patients when left untreated, possibly leading to growth failure, osteoporosis, rickets, nephrolithiasis and even renal insufficiency [1-6].

Defects in proximal bicarbonate reclamation or distal acid secretion give rise to the respective clinical syndromes of proximal or distal RTA [1-6]. These disorders can be primary, originating from genetic defects on tubular transport mechanisms [7], or secondary to systemic diseases and to adverse drug reactions [8-12]. The familial conditions exhibit distinct inheritance patterns. Distal RTA can be transmitted as either an autosomal dominant or an autosomal recessive trait, whereas isolated proximal RTA usually occurs as an autosomal recessive disease [6,7,13]. In the past few years, the molecular genetic strategies of positional cloning and candidate gene analysis have been combined to identify

the genes responsible for these inherited conditions [6,13]. This review will summarize the mechanisms of acid-base regulation by the kidney and the current understanding of the genetic causes of primary inherited RTA. It will, in addition, evaluate the ability of known functional and biochemical properties of these mutant proteins to explain the pathophysiology of associated renal acidification defects.

BRIEF OVERVIEW OF RENAL ACID-BASE HOMEOSTASIS

The kidney plays two major roles in acid-base homeostasis. First, the filtered bicarbonate load (approximately 4000 mmol/day) must be reabsorbed, mainly in the proximal tubule and beyond in the loop of Henle and distal nephron. This reclamation process in the proximal tubule minimally requires the following: hydrogen (H^+) secretion of an equivalent amount *via* the luminal Na^+/H^+ exchanger (NHE-3) and the vacuolar H^+ -ATPase; luminal carbonic anhydrase type IV (CAIV) and cytosolic carbonic anhydrase type II (CAII); and basolateral bicarbonate exit through the electrogenic Na^+ -dependent bicarbonate cotransporter (NBC-1) [2,14-17]. Second, the kidney must regenerate new bicarbonate (approximately 50 ± 100 mmol/day) in the process of acid-secretion, mainly in the collecting ducts, to match the amount of newly produced acid load by systemic metabolism [18,19]. In addition to sufficient buffer in the lumen, this process requires activities of several transport proteins of the acid secreting α -intercalated cells, including the luminal

*Address correspondence to this author at the Rua Engenheiro Amaro Lanari, 389 / apt 501, Belo Horizonte-Minas Gerais, 30310-580, Brazil; Tel: +55-31-99797782; Fax: +55-31-32851056; E-mail: eduolive@medicina.ufmg.br

vacuolar H⁺-ATPase, CA II, and the basolateral chloride-bicarbonate exchanger, AE1 [18,20,21].

Proximal Tubular Bicarbonate Reabsorption

HCO₃⁻ is freely filtered at the glomerulus and approximately 80 to 90% of this is reabsorbed in the proximal tubule [6]. In the tubular lumen, HCO₃⁻ combines with H⁺ in a reaction catalyzed by CA IV, which is bound to the luminal membrane of proximal tubular cells [2,14,15]. This reaction produces carbonic acid, which is promptly converted to CO₂ and H₂O. The resulting CO₂ rapidly diffuses into the tubular cells and is combined with water to produce intracellular H⁺ and HCO₃⁻. This intracellular reaction is catalyzed by CA II. HCO₃⁻ is then cotransported with Na⁺ into blood (with a probable stoichiometry of 3 HCO₃⁻ to 1 Na⁺) [6] *via* the NBC-1, located on the basolateral cell membrane. The intracellular H⁺ produced by CA II is secreted into the tubular lumen predominantly *via* the NHE-3, situated on the luminal membrane [6,15,22]. This transport process is called facilitated diffusion and depends on the sodium concentration gradient generated by the action of a basolateral membrane Na⁺-K⁺-ATPase. It should be mentioned that there is minimal net acid excretion in the proximal tubule, since most of the H⁺ secretion is coupled with HCO₃⁻ reabsorption [6,13]. The small amount of remaining H⁺ will be buffered by phosphate as titratable acid. HCO₃⁻ reabsorption is influenced by luminal HCO₃⁻ concentration and pH, luminal flow rate, peritubular pCO₂, and angiotensin II [2,6,17].

Proximal tubular cells are capable of generating “extra” bicarbonate through the deamination of glutamine to gluta-

mate, then forming α-ketoglutarate and eventually glucose. This metabolic process produces HCO₃⁻ and NH₄⁺; the former reclaimed *via* the basolateral membrane and the latter secreted into the tubular lumen. This pathway can be upregulated in states of chronic acidosis [3,6,15].

The main mechanisms of proximal tubular bicarbonate reabsorption are displayed in Fig. (1).

Distal Tubular Hydrogen Secretion

One of the important roles of the collecting duct segment of the nephron is acid secretion, combined with reclamation of the approximately 10% of filtered HCO₃⁻ that is not reabsorbed by more proximal nephron segments [18]. The average omnivorous human diet in the ‘Western’ world is rich in protein, and generates 1±1.5 mmol hydrogen/kg body weight each day [23]. Urinary acid excretion is therefore essential, and urine pH can drop as low as 4.5. The α-intercalated cell is the main responsible for hydrogen secretion into the urine. In humans at least, hydrogen pumps, called H⁺-ATPases, mainly carry out hydrogen secretion [18,19,23]. H⁺-ATPases are present at high density on the luminal membrane of α-intercalated cells [18]. Studies in nonhuman mammals show that these H⁺-ATPases are also present within specialized intracellular tubulovesicles close to the membrane, allowing additional pumps to be recruited to the membrane quickly in response to stimuli, such as systemic acidosis, for example [23]. These cells secrete H⁺ into the lumen of the distal tubule and collecting duct not only *via* H⁺-ATPase but possibly also by an exchanger, H⁺/K⁺-ATPase [7,10]. In addition, the normal function of the luminal H⁺-ATPase in α-

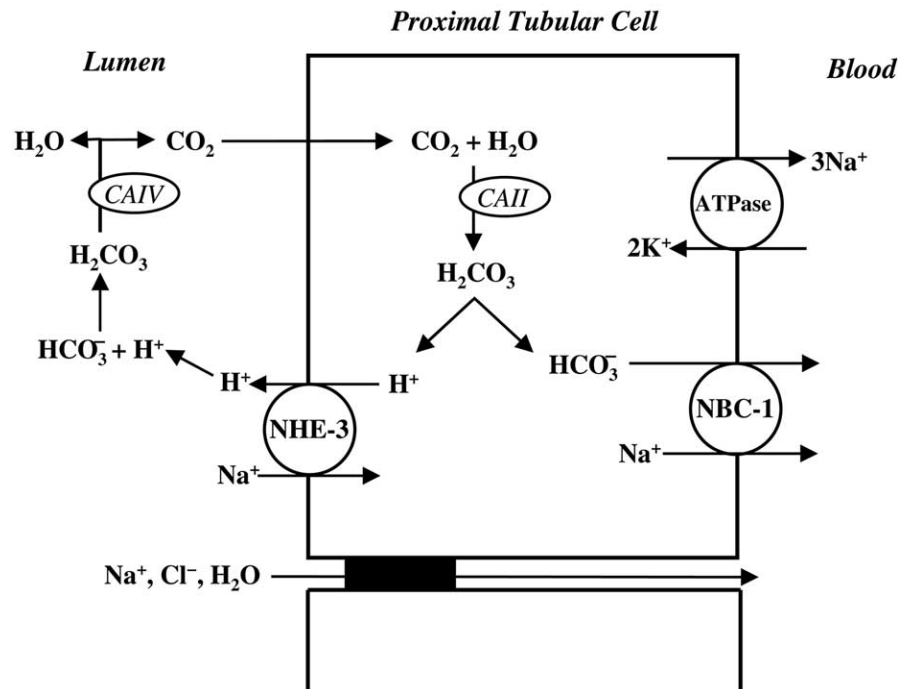


Fig. (1). Schematic model of bicarbonate (HCO₃⁻) proximal reabsorption. The intracellular carbonic acid (H₂CO₃) dissociates into H⁺ and HCO₃⁻ in a reaction catalysed by a cytoplasmic carbonic anhydrase (CAII). At the luminal membrane, H⁺ secretion is due to an specific Na⁺ - H⁺ exchanger (NHE-3), while, at the basolateral membrane, the 1 Na⁺ - 3 HCO₃⁻ cotransporter (NBC-1) is responsible for HCO₃⁻ transport to the peritubular capilar. The secreted H⁺ reacts with filtered HCO₃⁻ to form luminal H₂CO₃, which is dissociated into H₂O and CO₂ by the action of membrane-bound carbonic anhydrase (CAIV). The generated CO₂ diffuses back into the cell to complete the HCO₃⁻ reabsorption cycle.

intercalated cells is coupled, in a poorly understood manner, to the electroneutral transport of HCO_3^- back across the basolateral surface into the interstitial fluid, and hence to blood. The transporter responsible for this activity in renal α -intercalated cells is the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger AE1 [7,20,21]. The AE1 exchanger is homologous with the red cell anion exchanger known as 'band 3' (eAE1) [6,24]. After the red cell, the kidney is the next richest source of this protein (kAE1) [24]. Proton secretion varies with systemic pH and it is also aldosterone-dependent and voltage-dependent [24].

Once secreted, net urinary elimination of H^+ depends on its buffering and excretion as titratable acid (mainly phosphate - $\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^-$), and excretion as NH_4^+ [24]. Notably, the production of NH_4^+ from glutamine by the proximal tubule, and its subsequent excretion in the urine, also generates 'new' bicarbonate, which is added to plasma [24]. Availability of phosphate as a buffer depends on its filtration, whereas NH_4^+ depends on normal function of the proximal tubule, as well as a complex process of secretion, reabsorption, and secretion again along the nephron [24]. The final secretory step for NH_4^+ excretion is 'diffusion trapping' in the collecting duct. Anything that interferes with H^+ secretion in the collecting duct will reduce diffusion trapping and cause a decrease in excretion of both H^+ and NH_4^+ [6,24]. As previously mentioned, chronic metabolic acidosis stimulates renal NH_4^+ synthesis and excretion [3,6,15].

Fig. (2) shows renal acidification process in α -intercalated cells of the distal nephron.

CLASSIFICATION AND CLINICAL FEATURES OF RENAL TUBULAR ACIDOSIS

Clinically, RTA is characterized by a normal anion gap, hyperchloremic metabolic acidosis, and associated failure to

thrive secondary to growth failure as well as anorexia [13]. Polyuria and constipation can also be seen, although neither may be apparent in the neonatal period [13]. Hyperchloremic metabolic acidosis in pediatric practice is most often associated with diarrheal disease. Both diarrhea and RTA result in hypokalemia. For this reason, in a young infant with diarrhea and underlying RTA, the true diagnosis may be obscured. Thus, inordinately slow resolution of hyperchloremic metabolic acidosis following diarrheal disease should suggest the possibility of an underlying primary RTA [13].

Beyond the difficulties inherent in delineating RTA, RTA can be subcategorized into different disorders with distinctly diverse prognoses [13]. The diagnostic cataloguing of RTA is based on the underlying pathophysiology. The current model of how the nephron reabsorbs HCO_3^- and secretes H^+ has led to a clinical and functional classification of proximal (tubule) versus distal (tubule and collecting duct) forms of RTA [24]. Thus, the main types of RTA are proximal (or type 2) RTA and distal (or type 1) RTA. Type 3 RTA is a mixed type RTA that exhibits both impaired proximal HCO_3^- reabsorption and impaired distal acidification, and more disturbingly osteopetrosis, cerebral calcification and mental retardation [4]. Hyperkalemic (or type 4) RTA is a heterogeneous group of disorders that is characterized by low urine NH_4^+ , which is probably caused by the hyperkalemia or by aldosterone deficiency or defective signaling [4].

In distal RTA, distal nephron net acid secretion is impaired. This leads to a high urine pH, even in the presence of systemic acidosis [2,4]. However, there is often no metabolic acidosis and the blood bicarbonate concentration is normal, so-called 'incomplete' distal RTA, and a defect in renal acid excretion must be demonstrated by a failure to lower urine

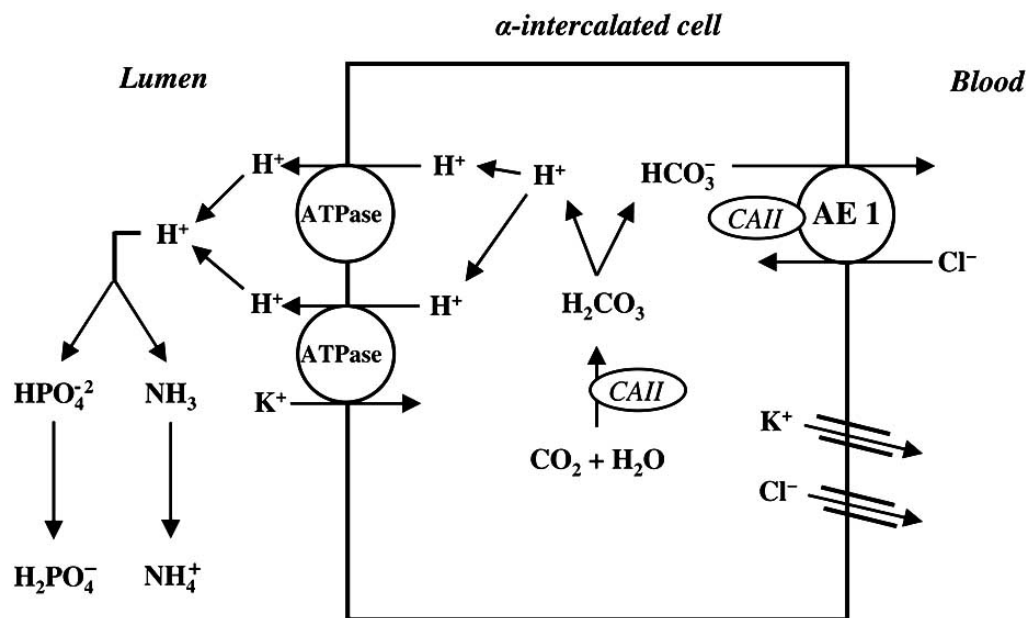


Fig. (2). Schematic model of the α -intercalated cell and the H^+ secretion in cortical collecting tubule. The α -intercalated cell is responsible for H^+ secretion by a vacuolar H^+ -ATPase (main pump) and also by a H^+ - K^+ -ATPase. The luminal ammonia (NH_3) buffers H^+ to form nondiffusible ammonium (NH_4^+) and divalent basic phosphate (HPO_4^{2-}) is converted to the monovalent acid form (H_2PO_4^-) in H^+ presence. Intracellularly formed HCO_3^- leaves the cell via $\text{Cl}^- - \text{HCO}_3^-$ exchange, facilitated by an anion exchanger (AE1). Cytoplasmic carbonic anhydrase II (CA II) is necessary to secrete H^+ .

pH below 5.5 following an NH_4Cl load or a modified furosemide test [2,6,24]. Acquired distal RTA is often secondary to autoimmune diseases, such as Sjogren's syndrome [6,24]. Inherited distal RTA can be essentially of three types: autosomal dominant distal RTA (the commonest form) and autosomal recessive distal RTA with and without sensorineural deafness [24]. In the complete forms of both dominant and recessive distal RTA bone disease is common (rickets or osteomalacia), as well as nephrocalcinosis (often complicated by renal stone disease). The occurrence of renal stones is attributed to the combination of hypercalciuria, low urinary citrate excretion (due to systemic and intracellular acidosis) and high urine pH, all favouring calcium phosphate stone formation. Hypokalaemia, another characteristic feature, is less troublesome than in the acquired autoimmune form of distal RTA, but it can become symptomatic, especially if a thiazide diuretic is prescribed to reduce hypercalciuria [24]. In recessive distal RTA, some patients suffer from sensorineural deafness, which can be late in onset [24].

Conceptually, the proximal tubule is charged with the task of reclaiming filtered HCO_3^- (~ 85% of the total) [13]. Failure of this process leads to reduction in systemic base, resulting in metabolic acidosis – proximal RTA [13]. Proximal RTA typically manifests as part of a generalized defect of proximal tubule function, namely the renal Fanconi's syndrome (with glycosuria, low molecular weight proteinuria, urinary phosphate wasting, hypophosphataemia and hypouricaemia) [24]. Isolated proximal RTA occurs rarely and usually presents as growth retardation in childhood. Like distal RTA, it can be divided into three types: autosomal recessive proximal RTA with ocular abnormalities, autosomal recessive proximal RTA with osteopetrosis and cerebral calcification, and autosomal dominant proximal RTA [24]. Autosomal recessive proximal RTA with ocular abnormalities is the commonest form of isolated and inherited proximal RTA, but even this is rare. Ocular abnormalities include band keratopathy, glaucoma and cataracts [24]. Short stature is usual; dental enamel defects, mental retardation, hypothyroidism, abnormal pancreatic function and basal ganglia calcification are also features [24,25]. In inherited CA II deficiency, isolated proximal RTA presents with osteopetrosis (due to impaired osteoclast function), cerebral calcification and variable mental retardation [26]. Although this form of inherited RTA is clinically more proximal in type, it can also present with a mixed proximal and distal phenotype, which reflects the presence of CA II in cells all along the renal tubule.

Type 3 RTA can be caused by recessive mutation in the CA2 gene on chromosome 8q22, which encodes CAII [4] or

could involve direct interaction between CA II and the NBC1 [27] or $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger, *SLC26A6* [4,28].

The causes of type 4 RTA include various types of adrenal failure or pseudohypoaldosteronism type 1 (PHA1) due to defects in the mineralocorticoid receptor or the epithelial Na^+ channel, all characterized by salt loss and hypotension [4]. A similar picture may be seen in obstructive uropathy or drug induced interstitial nephritis [4]. Furthermore, a number of drugs may impair signalling in the renin-angiotensin-aldosterone system and cause hyperkalemia and metabolic acidosis (e.g. potassium sparing diuretics, trimethoprim, cyclo-oxygenase inhibitors, angiotensin converting enzyme inhibitors) [4]. Lately, much interest has been given to a group of rare autosomal dominant diseases characterized by hyperkalaemia and acidosis and age-related hypertension [4]. In spite of hypervolaemia, aldosterone is not low and the disorders have been collectively termed pseudohypoaldosteronism type 2 (PHA2) [4].

INHERITED FORMS OF DISTAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS

Inherited forms of distal RTA have three variants: autosomal dominant and autosomal recessive with or without deafness. Dominant disease typically presents more mildly in adolescence or adulthood, and recessive variant occurs in infancy/early childhood, where growth retardation is common [6]. In Table 1 we can see the chromosome mapping of distal RTA.

Autosomal Dominant Distal RTA (Distal RTA Type 1a)

Distal RTA occurs with the greatest frequency as an isolated defect, often transmitted as an autosomal dominant trait [13]. In few reported families, the presence of the disorder in several generations suggests an autosomal dominant transmission. Although clinical findings are not different from those observed in autosomal recessive or sporadic cases, in these patients the disease may be diagnosed later (in adolescence or adulthood) [6] or manifest with milder symptomatology.

Autosomal dominant distal RTA has been found to be associated in several kindred with mutations in the *SLC4A1* gene encoding the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger, AE1 [15].

The Electroneutral Anion Exchanger (AE1)

The $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anion exchanger, AE1, is a glycoprotein encoded by a gene (*SLC4A1*) present on chromosome 17 q21-22. *SCL4A1* gene is a member of the *SLC4* family com-

Table 1. Chromosome Mapping of the Inherited Distal Renal Tubular Acidosis

Inherited Distal RTA	Gene	Mapping	Protein Encoded
Autosomal dominant	<i>SLC4A1</i>	Chromosome 17q21-q22	AE 1 exchanger
Autosomal recessive (with deafness)	<i>ATP6V1B1</i>	Chromosome 2q13	B1-subunit of H^+ -ATPase
Autosomal recessive (with preserved hearing)	<i>ATP6VOA4</i>	Chromosome 7 q33-q34	a4 isoform subunit of H^+ -ATPase

prising 10 genes of which 8 encode bicarbonate ion transporters [6,24,29]. AE1 is an integral membrane glycoprotein containing a long cytoplasmic N-terminus (~ 400 amino acids), 12–13 transmembrane domains (responsible for anion transport and dimerization), and a short cytoplasmic C-terminus (~ 35 amino acids) [30,31]. It is predominantly expressed in the erythrocytes (eAE1) and in the kidney (kAE1).

kAE1 is a truncated isoform of eAE1 with lacking of 65 amino acids at the N-terminus owing to the use of differential transcription and translation start sites [32]. This extra NH₂-terminal sequence confers additional roles for eAE1, including facilitation of red cell metabolism and maintenance of erythrocyte structural stability *via* interaction with a glycolytic enzyme complex and cytoskeletal elements, respectively [6]. kAE1 mediates an electroneutral exchange of chloride for bicarbonate at the basolateral membrane of acid secreting α -intercalated cells of the distal nephron and collecting duct [32,33]. This ion exchanger promotes the reabsorption of bicarbonate into the blood. Therefore, eAE1 defect results in morphological changes of red blood cells (RBC) while kAE1 abnormality leads to distal RTA [32].

The physiological role of kAE1 in the regulation of distal nephron acid secretion is well established. In the acidification process of the distal nephron, basolateral kAE1 mediates Na⁺-independent, electroneutral Cl⁻/HCO₃⁻ exchange, allowing HCO₃⁻ to exit the α -intercalated cells in concert with apical H⁺ secretion *via* the vacuolar H⁺-ATPase.

AE1 Gene (SLC4A1) Mutations

Because of the expression of AE1 in two different cells (RBC and α -intercalated distal tubular cells) with distinct functions, AE1 mutations show pleiotropic effects resulting in two distinct and seemingly unrelated phenotypes: hereditary spherocytosis (or other forms of erythrocyte abnormalities) and distal RTA [31]. The largest group of mutations in human AE1 is associated with autosomal-dominant red cell dysmorphologies (hereditary spherocytosis – HS; and Southeast Asian ovalocytosis - SAO), where renal acid-base handling is normal [6]. AE1 mutations also result in distal RTA, because the defect in AE1 affects anion Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger at the basolateral membrane of the α -intercalated cells in the distal nephron [31].

SAO, a well-known erythrocyte disorder, is caused by a deletion of 27 bp in codons 400–408 in exon 11 (Ex11D27) of AE1 leading to a lack of 9 amino acids in the protein, which is inactive for anion transport.

How can be explained either the absence of red cell abnormalities in patients with distal RTA or the rarity of defects in distal urinary acidification in patients with hematological disorders, when, in both circumstances, mutations in the same *SLC4A1* gene are present? [15]. One exception is the homozygous AE1 mutant V488M (Band 3 Coimbra; GTG → ATG), which presents with severe anemia and renal acidification defect [34,35].

The majority of AE1 mutations apparently cause only erythroid abnormalities without renal phenotype. Most cause autosomal dominant forms of HS and are not encountered in homozygous form, suggesting embryonic lethality [7].

Dominant HS-associated AE1 mutations are generally not associated with distal RTA. Conversely, distal RTA-associated AE1 mutations are also not commonly accompanied with HS. Whereas HS missense mutations are distributed throughout AE1 cytoplasmic and transmembrane domains, distal RTA mutations are restricted to AE1's transmembrane domain. Although, the almost complete segregation between mutations associated with HS and with distal RTA is not fully understood [7].

Autosomal dominant distal RTA was first associated with exon 14 nucleotide substitutions encoding missense mutations in residue 589 (R589), in which the wild-type Arg is converted to His, Ser, or Cys [30,36]. A single base change alters the identical AE1 residue, R589, in eight of the ten reported kindred with dominant distal RTA, supporting the importance of this residue in the normal acidification process. R589 lies at the intracellular border of the sixth transmembrane domain of the protein, adjacent to K590. These basic residues are conserved in all the known vertebrate anion exchanger isoforms and are thought to form part of the site of intracellular anion binding. Arginine at this position is conserved in all vertebrate AE proteins, indicating its functional importance [37].

Three different mutations at this position (R589C, R589H, and R589S) were found in autosomal dominant distal RTA and two *de novo* R589H mutations have also been reported [30,32,36]. A high prevalence of AE1 R589 mutations and the presence of at least two *de novo* mutations at this position suggest that codon 589 (CGC) is a “mutational hotspot” of AE1. The mechanism of recurrent mutations probably involves methylation and deamination altering cytosine (C) to thymine (T) in the CpG dinucleotides [37].

Another missense mutation alters serine to phenylalanine at position 613 [36] within the adjacent transmembrane loop, evidencing the importance of this region of the protein. A further complex mutation results in a C-terminally truncated AE1 protein lacking the last 11 amino acids [29].

AE1 in Autosomal Recessive Distal RTA

Recent gene studies have shown that some of the AE1 mutations are responsible for autosomal recessive distal RTA in several countries in Southeast Asia; these patients may be homozygous for the mutation or be compound heterozygotes of two different AE1 mutations, one of which is usually the SAO mutation [38,39]. The evaluation of the AE1 G701D mutation has provided the first explanation for how any distal RTA-associated AE1 mutation might cause the disease [40].

Recessive distal RTA appears to result from the absence or a very marked deficiency of chloride-bicarbonate exchange activity in the basolateral membrane of the distal α -intercalated cell. In the case of the G701D mutation this occurs because the mutant protein is totally dependent on the presence of glycophorin A (GPA) for its movement to the cell surface. GPA is a glycosylated protein that is associated with band 3 and has a single span across the erythrocyte membrane [38]. Expression in *Xenopus* oocytes demonstrated that GPA completely rescues the cell surface movement of the G701D mutant band 3 to normal levels. This contrasts with normal band 3, which moves to the cell sur-

face even in the absence of GPA, although GPA further enhances this movement. Red blood cells contain GPA but GPA is absent from the kidney, hence individuals homozygous for the G701D mutation have normal levels of band 3 in their red cells. It is proposed that, in homozygotes, the mutant G701D protein does not reach the basolateral membrane of the α -intercalated cell, but is turned over within the cell. In SAO/G701D compound heterozygotes, the SAO protein is presumed to reach the cell surface, but since it is inactive in anion transport, it acts as if it were a band 3 null allele [38].

Autosomal Recessive Distal RTA with Deafness (Distal RTA Type 1b)

Recessive forms of distal RTA are related to mutations in the proton pump in α -intercalated cells. The gene involved (*ATP6V1B1*) is located on chromosome 2q13, and encodes the B1-subunit of H^+ -ATPase expressed apically on α -intercalated cells and also in the cochlea and endolymphatic sac [4,23].

In the human cochlea, the H^+ -ATPase appears to be required to maintain normal endolymph pH [6] given that the very high potassium concentration (approximately 150 mmol/l) in this closed compartment is not normally accompanied by alkalinity of the endolymph [23]. *ATP6V1B1* expression has also been observed in the male genital tract (with acidification requirement for sperm maturation) [29].

Clinical findings, other than deafness, are identical to those present in patients with sporadic or autosomal recessive distal RTA and normal hearing. There is great variation in the presentation of deafness, from birth to late childhood, it is progressive and does not respond alkali therapy [15]. The defects in B1 cause irreversible hair cell damage in human cochlea because of ambient electrolyte and pH abnormalities [29].

Screening for mutations in this gene revealed fifteen different mutations in kindred. The majority of these mutations are likely to disrupt the structure, or abrogate the production, of the normal B1 subunit protein [29].

The Human Vacuolar H^+ -ATPase

The vacuolar-type proton ATPase (V- or H^+ -ATPase) is a multisubunit pump that is essential for normal acidification of intracellular vesicular structures. In each individual cell, H^+ -ATPases may function in a variety of distinct but essential cellular processes. However, the mechanisms by which cells regulate the intracellular trafficking, final destination and activity of these proton pumps are unclear [41].

The H^+ -ATPases are composed of two structural domains (membrane-bound V_0 and cytoplasmic or peripheral V_1) each formed of multiple subunits (a-e and A-H, respectively), which are responsible for ATP hydrolysis and proton transport, respectively [6,23]. The mammalian H^+ -ATPase is presumed to be similar to that of yeast (in which most of the structural studies have been performed) [23].

Autosomal Recessive Distal RTA with Preserved Hearing (Distal RTA Type 1c)

Individuals without hearing defects carry mutations at chromosome 7 q33-q34. The defective gene is *ATP6V0A4*,

which encodes a kidney-specific $\alpha 4$ isoform subunit of H^+ -ATPase. The involvement of the $\alpha 4$ subunit in distal RTA shows that it must be essential for proper proton pump function in the kidney [29], but its role is not totally clear.

Site-directed mutagenesis studies of the yeast 'a' subunit ortholog Vph1p (the 'a' subunit in proton pumps localized to the yeast vacuole) have yielded some potential functions [42]. Some mutations showed that this subunit is important for the assembly of the proton pump, whereas other mutations had greater effects on ATPase activity and proton transport. These studies suggest that the 'a' subunit is important for both assembly and function of the pump [29,42].

INHERITED FORMS OF PROXIMAL RENAL TUBULAR ACIDOSIS

Proximal RTA is caused by a reduction in bicarbonate reabsorption at the proximal tubules, resulting in low renal bicarbonate threshold. The most common proximal RTA in children is secondary to Fanconi Syndrome [2,43]. Rarely, RTA might also be consequence of an inherited or sporadic primary renal disorder.

The acquired proximal RTA follows exposure to drugs or some toxins and the etiopathogenesis is still unknown [2]. Among drugs that cause Fanconi Syndrome are gentamicin, cisplatin, ifosfamide, and sodium valproate [6]. In addition, some hematologic and autoimmune conditions, such as myeloma and Sjogren syndrome respectively, might also course with proximal RTA.

The proximal RTA resulting from Fanconi Syndrome is frequently part of a systemic syndrome. Among systemic disorders that result in RTA, the inheritance pattern is usually autosomal recessive. Some of these disorders are cystinosis, tyrosinaemia, galactosaemia, Fanconi-Bickel syndrome and others (Table 2) [44]. These syndromes are a heterogeneous group of disorders, which genes are mapped in many chromosome regions.

The RTA non-related to Fanconi Syndrome is a rare disorder and might be sporadic, autosomal dominant or autosomal recessive. The autosomal recessive disorder is associated with ocular abnormalities, frequently coursing with mental retardation. Other clinical features are short stature, dental enamel defects, pancreatitis, and basal ganglia calcification [45]. Loss-of-function mutations in the gene that codifies the NBC-1, the *SLC4A4* gene, were first identified in two Japanese subjects with proximal RTA associated with cataracts, glaucoma and band keratopathy [46]. NBC-1 is formed by 1,035 amino acids; it contains ten transmembrane domains and two cytoplasmic termini, and it is present in kidney, brain, eye, pancreas, heart, prostate, epididymis, stomach, and intestine. In the kidney, NBC-1 is expressed mainly at the basolateral membrane of the proximal tubule. At least two genes encode the NBC proteins. Mutations were identified in the human NBC-1 gene (*SLC4A4*) mapped at chromosome 4p21 [47,48].

Another interesting candidate gene for proximal RTA is the *TASK* gene. *TASK2*-potassium channel is a member of the tandem-pore domain potassium channel family and is located in pancreas, placenta, lung, small intestine, colon and kidney. *TASK2* seems to be important to bicarbonate ab-

Table 2. Chromosome Mapping of the Inherited Fanconi Syndromes

Inherited Fanconi Syndromes	Gene	Mapping
Autosomal recessive	<i>SLC4A4</i>	Chromosome 4q21
Dent's syndrome	<i>CLCN5</i>	Chromosome Xp11.22
Cystinosis	<i>SLC3A1</i> <i>SLC7A9</i>	Chromosome 2p21 Chromosome 19p13.1
Tyrosinaemia type 1	<i>FAH</i> gene	Chromosome 15q23-q25
Galactosemia	<i>GALT</i> gene	Chromosome 9p13
Wilson's disease	<i>ATP7B</i> gene	Chromosome 13q14.3-q21.1

sorption in renal proximal tubules. Knockout mice for *TASK2* gene course with metabolic acidosis associated with low bicarbonate levels [49]. However, no mutation in these genes was yet identified in individuals with proximal RTA.

Other inherited form of proximal RTA is the one resulting from mutations in the gene *CA2* that encodes CAII. The carbonic anhydrases (CA) are member of a family of zinc metalloenzymes that catalyzes the hydration of CO₂. The human *CA2* maps to the chromosome region 8q22. In the kidney, the majority of CA activity is attributable to CA II, which is localized in proximal tubular cells and in α -intercalated cells of the cortical and outer medullary collecting tubules [50]. Due to their localization, this RTA course with some proximal and distal components. In terms of clinical aspects, this RTA present osteopetrosis, cerebral calcification and different levels of mental retardation.

The autosomal dominant proximal RTA was originally described in a large Costa Rican family [51,52], consisting of nine individuals presenting growth retardation and osteomalacia. No gene was found to be associated with this clinical presentation. Recently, another family with isolated proximal RTA inherited as an autosomal dominant disease was described [53]. The father and all four children had RTA with blood bicarbonate levels of 11-14 mEq/L and urine pH of 5.3-5.4 and all presented high bicarbonate fractional excretion. In terms of clinical aspects, they course only with short stature without other organ dysfunction. This family was investigated at the following genes: *CA II*, *CA IV*, *CA XIV*, *NCB1*, *Na⁺/H⁺ exchanger (NHE-3)*, *NHE-8*, the regulatory proteins of *NHE3*, *NHRF1* and *NHRF2* and the *Cl-HCO₃⁻ exchanger*, *SLC26A6*. However, no mutation was found in any of the candidate genes studied. The study of these families might clarify other mechanisms involved in renal bicarbonate balance and a genome wide investigation of a pool of these families might result in interesting findings.

INHERITED FORMS OF RENAL TUBULAR ACIDOSIS TYPE 3

Type 3 RTA is a mixed type that exhibits both impaired proximal HCO₃⁻ reabsorption and distal acidification. The condition is due to an inherited deficiency of CAII caused by a recessive mutation in the *CA2* gene on chromosome 8q22, which encodes this widely expressed enzyme [4,6]. The ex-

pression of CAII is affected in bone, kidney (in both proximal and distal nephron segments, explaining the mixed acidosis) and brain.

The mechanisms that underlie the clinical picture in type 3 RTA, apart from much slower conversion of carbonic acid to and from bicarbonate, apparently also involve direct interaction between CA II and the kidney NBC1 [27] or Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger, *SLC26A6* (a plasma membrane Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger with a suggested role in pancreatic HCO₃⁻ secretion) [4,28]. Mutation of the identified CAII binding site reduced *SLC26A6* activity, demonstrating the importance of this interaction [28].

Patients with this deficiency exhibit osteopetrosis and cerebral calcification, as well as a mixed RTA with proximal and distal components [29]. This association of osteopetrosis and RTA is known as Guibaud-Vainsel syndrome or marble brain disease. Osteopetrosis is a condition of increased bone density, but also augmented bone fragility, leading to increased fracture risk, plus intracerebral calcification, intellectual impairment, growth failure, and facial dysmorphism. Excess bone growth leads to conductive deafness and can also cause blindness through compression of the optic nerve [6].

There is a considerable degree of heterogeneity, both in the predominance of proximal or distal acidosis and in the osteopetrotic phenotype [6]. In different kindred, mild or severe mental retardation has also been described.

Different mutations in *CA2* gene have been described; for example, the common 'Arabic' mutation, consisting of loss of the splice donor site at the 5' end of intron 2 [6,29].

INHERITED FORMS OF HYPERKALEMIC RENAL TUBULAR ACIDOSIS

Type 4 RTA is a heterogeneous group of disorders associated with hyperkalemia due to aldosterone deficiency or impairment in aldosterone molecular signaling.

Type 4 RTA might result from a *PHA1*. Some clinical aspects associated are hyponatremia, hyperkalemia, and elevated plasma aldosterone and plasma renin activity. The inheritance might be autosomal dominant or autosomal recessive [54]. The autosomal dominant is a frequent and mild kidney disorder without any other organ involvement [55].

This disorder seems to be associated to loss-of-function mutations in the mineralocorticoid receptor gene, the *MRL* gene. *MRL*-knockout mice develop symptoms of pseudohypoaldosteronism. In humans clinical presentation varies from non-symptomatic to important neonatal sodium loss. The recessive inheritance is associated to sodium transport defects in all aldosterone target tissues, not only kidney, but also colon, lungs, salivary and sweat glands. The recessive disorder is more severe and salt wasting is normally more pronounced. However, both types of inheritance might result in the same degree of natriuresis, hyperkalaemia and metabolic acidosis.

Other inherited cause of type 4 RTA includes hyperkalaemia associated with hypertension and low or normal levels of plasma aldosterone [56-58]. This syndrome is called pseudohypoaldosteronism type 2 (PHA2), or Gordon's syndrome, which results in a renal aldosterone resistance inherited as an autosomal dominant pattern [6]. Mutations in the gene of two isoforms of WNK serine-threonine kinases, *WNK4* and *WNK1* genes, were identified in patients with PHA2 [59]. WNKs are serine kinase proteins lacking a lysine residue at the active site, being the WNK type 1 a regulatory protein from *WNK 4*. *WNK4* is found in the distal nephron and controls the sodium and chloride reuptake and inhibits potassium efflux [6].

CONCLUDING REMARKS

Renal tubular acidosis (RTA) is characterized by metabolic acidosis due to renal impaired acid excretion. In this review, we summarized our current understanding of the hereditary diseases caused by mutations in genes encoding transporter or channel proteins operating along the renal tubule. Further molecular studies of inherited tubular transport disorders may shed more light on the molecular pathophysiology of these diseases and may significantly improve our understanding of the mechanisms underlying renal salt homeostasis, urinary mineral excretion, and blood pressure regulation in health and disease. The identification of the molecular defects in inherited tubulopathies may provide a basis for future design of targeted therapeutic interventions and, possibly, strategies for gene therapy of these complex disorders.

ABBREVIATIONS

RTA	= Renal Tubular Acidosis
NHE-3	= Na ⁺ /H ⁺ exchanger
CAIV	= Carbonic anhydrase type IV
CAII	= Carbonic anhydrase type II
NBC-1	= Na ⁺ -dependent bicarbonate cotransporter
AE1	= Basolateral chloride-bicarbonate exchanger
eAE1	= Red cell anion exchanger
kAE1	= Kidney anion exchanger
CA2	= Carbonic anhydrase gene
PHA1	= Pseudohypoaldosteronism type 1
PHA2	= Pseudohypoaldosteronism type 2

RBC	= Red blood cells
HS	= Hereditary spherocytosis
SAO	= Southeast Asian ovalocytosis
GPA	= Glycophorin A

REFERENCES

- [1] Herrin, J.T. Renal tubular acidosis. In: Avner, E.D., Harmon, W.E., Niaudet, P. *Pediatric Nephrology*. Philadelphia: Williams & Wilkins **2003**, 757-776.
- [2] Rodríguez-Soriano, J. Renal tubular acidosis: the clinical entity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2002**, *13*: 2160-2170.
- [3] Smulders, Y.M., Frissen, P.H., Slaats, E.H., Silberbusch, J. Renal tubular acidosis. Pathophysiology and diagnosis. *Arch. Intern. Med.* **1996**, *156*: 1629-1636.
- [4] Ring, T., Frische, S., Nielsen, S. Clinical review: renal tubular acidosis - a physicochemical approach. *Crit. Care* **2005**, *9*: 573-580.
- [5] Gregory, M.J., Schwartz, G.J. Diagnosis and treatment of renal tubular disorders. *Semin. Nephrol.* **1998**, *18*: 317-329.
- [6] **Fry, A.C., Karet, F.E. Inherited Renal Acidoses. *Physiology* **2007**, *22*: 202-211.
**an excellent genetic review.
- [7] Alper, S.L. Genetic diseases of acid-base transporters. *Annu. Rev. Physiol.* **2002**, *64*: 899-923.
- [8] Zawadzki, J. Permeability defect with bicarbonate leak as a mechanism of immune-related distal tubular acidosis. *Am. J. Kidney Dis.* **1998**, *31*: 527-532.
- [9] Guizar, J.M., Kornhauser, C., Malacara, J.M., Sanchez, G., Zamora, J. Renal tubular acidosis in children with vesicoureteral reflux. *J. Urol.* **1996**, *156*: 193-195.
- [10] Eiam-Ong, S., Dafnis, E., Spohn, M., Kurtzman, N.A., Sabatini, S. H-K-ATPase in distal renal tubular acidosis: urinary tract obstruction, lithium, and amiloride. *Am. J. Physiol.* **1993**, *265*: 875-880.
- [11] Pessler, F., Emery, H., Dai, L., Wu, Y.M., Monash, B., Cron, R.Q., Pradhan, M. The spectrum of renal tubular acidosis in paediatric Sjogren syndrome. *Rheumatology (Oxford)* **2006**, *45*: 85-91.
- [12] Hemstreet, B.A. Antimicrobial-associated renal tubular acidosis. *Ann. Pharmacother.* **2004**, *38*: 1031-1038.
- [13] Roth, K.S., Chan, J.M.C. Renal tubular acidosis: a new look at an old problem. *Clin. Pediatr. (Phila)* **2001**, *40*: 533-543.
- [14] Alpern, R.J. Renal acidification mechanisms. In: Brenner BM. Brenner & Rector's *The Kidney* 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company **2000**, 455-519.
- [15] *Rodríguez-Soriano, J. New insights into the pathogenesis of renal tubular acidosis—from functional to molecular studies. *Pediatr. Nephrol.* **2000**, *14*: 1121-36.
*a good review on physiology of renal tubular acidosis.
- [16] Dubose, T.D. Jr. Acid-base disorders. In: Brenner BM. Brenner & Rector's *The Kidney*. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company **2000**, 925-997.
- [17] Soleimani, M., Burnham, C.E. Physiologic and molecular aspects of the Na⁺: HCO₃⁻ cotransporter in health and disease processes. *Kidney Int.* **2000**, *57*: 371-384.
- [18] Biner, H.L., Arpin-Bott, M.P., Loffing, J., Wang, X., Knepper, M., Hebert, S.C., Kaissling, B. Human cortical distal nephron: distribution of electrolyte and water transport pathways. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2002**, *13*: 836-847.
- [19] Wagner, C.A., Geibel, J.P. Acid-base transport in the collecting duct. *J. Nephrol.* **2002**, *15* (Suppl 5): 112-27.
- [20] Alper, S.L., Darman, R.B., Chernova, M.N., Dahl, N.K. The AE gene family of Cl-/HCO₃⁻ exchangers. *J. Nephrol.* **2002**, *15* (Suppl 5): 41-53.
- [21] Cheidde, L., Vieira, T.C., Lima, P.R.M., Saad, S.T.O., Heilberg, I.P. A novel mutation in the anion exchanger 1 gene is associated with familial distal renal tubular acidosis and nephrocalcinosis. *Pediatrics.* **2003**, *112*: 1361-1367.
- [22] Schwartz, G.J. Physiology and molecular biology of renal carbonic anhydrase. *J. Nephrol.* **2002**, *15* (Suppl 5): 61-74.
- [23] Borthwick, K.J., Karet, F.E. Inherited disorders of the H⁺-ATPase. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2002**, *11*: 563-568.

- [24] Laing, C.M., Toye, A.M., Capasso, G., Unwin, R.J. Renal tubular acidosis: developments in our understanding of the molecular basis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2005**, *37*: 1151-1161.
- [25] **Igarashi, T., Sekine, T., Inatomi, J., Seki, G. Unraveling the molecular pathogenesis of isolated proximal renal tubular acidosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2002**, *13*: 2171-2177.
**interesting original article of RTA.
- [26] *Sly, W.S., Hewett-Emmett, D., Whyte, M.P., Yu, Y.S., Tashian, R.E. Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*: 2752-2756.
*original article of RTA.
- [27] Pushkin, A., Abuladze, N., Gross, E., Newman, D., Tatishchev, S., Lee, I., Fedotoff, O., Bondar, G., Azimov, R., Ngyuen, M., Kurtz, I. Molecular mechanisms of kNBC1-carbonic anhydrase II interaction in proximal tubule cells. *J. Physiol.* **2004**, *559*: 55-65.
- [28] Alvarez, B.V., Vilas, G.L., Casey, J.R. Metabolon disruption: a mechanism that regulates bicarbonate transport. *EMBO J.* **2005**, *24*: 2499-2511.
- [29] Karet, F.E. Inherited Distal Renal Tubular Acidosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2002**, *13*: 2178-2184.
- [30] Karet, F.E., Gainza, F.J., Györy, A.Z., Unwin, R.J., Wrong, O., Tanner, M.J., Nayir, A., Alpaly, H., Santos, F., Hulton, S.A., Bakaloglu, A., Ozen, S., Cunningham, M.J., Di Pietro, A., Walker, W.G., Lifton, R.P. Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**, *95*: 6337-6342.
- [31] Yenchitsomanus, P.T., Sawasdee, N., Paemane, A., Keskanokwong, T., Vasuvattakul, S., Bejrachandra, S., Kunachiwa, W., Fucharoen, S., Jitphakdee, P., Yindee, W., Promwong, C. Anion exchanger 1 mutations associated with distal renal tubular acidosis in the Thai population. *J. Hum. Genet.* **2003**, *48*: 451-456.
- [32] Sawasdee, N., Udomchaiprasertkul, W., Noisakran, S., Rungroj, N., Akkarapatumwong, V., Yenchitsomanus, P.T. Trafficking defect of mutant kidney anion exchanger 1 (kAE1) proteins associated with distal renal tubular acidosis and Southeast Asian ovalocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *350*: 723-730.
- [33] Shayakul, C., Alper, S.L. Defects in processing and trafficking of the AE1 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger associated with inherited distal renal tubular acidosis. *Clin. Exp. Nephrol.* **2004**, *8*: 1-11.
- [34] Ribeiro, M.L., Alloisio, N., Almeida, H., Gomes, C., Texiera, P., Lemos, C., Mimoso, G., Morlé, L., Bey-Cabet, F., Rudigoz, R.C., Delaunay, J., Tamagnini, G. Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3. *Blood* **2000**, *96*: 1602-1604.
- [35] Shayakul, C., Jarolim, P., Zachlederova, M., Prabakaran, D., Cortez-Campeao, D., Kalabova, D., Stuart-Tilley, A.K., Ideguchi, H., Haller, C., Alper, S.L. Characterization of a highly polymorphic marker adjacent to the SLC4A1 gene and of kidney immunostaining in a family with distal renal tubular acidosis. *Nephrol. Dial. Transplant* **2004**, *19*: 371-379.
- [36] Bruce, L.J., Cope, D.L., Jones, G.K., Schofield, A.E., Burley, M., Povey, S., Unwin, R.J., Wrong, O., Tanner, M.J. Familial distal renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (Band 3, AE1) gene. *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*: 1693-1707.
- [37] Sritippayawan, S., Kirdpon, S., Vasuvattakul, S., Wasanawatana, S., Susaengrat, W., Waiyawuth, W., Nimmannit, S., Malasit, P., Yenchitsomanus, P.T. A de novo R589C mutation of anion exchanger 1 causing distal renal tubular acidosis. *Pediatr. Nephrol.* **2003**, *18*: 644-648.
- [38] Wrong, O., Bruce, L.J., Unwin, R.J., Toye, A.M., Tanner, M.J. Band 3 mutations, distal renal tubular acidosis, and Southeast Asian ovalocytosis. *Kidney Int.* **2002**, *62*: 10-19.
- [39] Vasuvattakul, S., Yenchitsomanus, P.T., Vachuanichsanong, P., Thuwajit, P., Kaitwatcharachal, C., Laosombat, V., Malasit, P., Wilairat, P., Nimmannit, S. Autosomal recessive distal renal tubular acidosis associated with Southeast Asian ovalocytosis. *Kidney Int.* **1999**, *56*: 1674-1682.
- [40] Shayakul, C., Alper, S.L. Inherited renal tubular acidosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2000**, *9*: 541-546.
- [41] Smith, A.N., Borthwick, K.J., Karet, F.E. 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*: 169-177.
- [42] Leng, X.H., Manolson, M.F., Liu, Q., Forgacs, M. Site-directed mutagenesis of the 100-kDa subunit (Vph1p) of the yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*: 22487-22493.
- [43] Foreman, J.W., Roth, K.S. Human renal Fanconi syndrome- then and now. *Nephron.* **1989**, *51*: 301-306.
- [44] Zeljkovic, I. Molecular pathophysiology of tubular transport disorders. *Pediatr. Nephrol.* **2001**, *16*: 919-935.
- [45] Dinour, D., Chang, M.H., Satoh, J., Smith, B.L., Angle, N., Knecht, A., Serban, I., Holtzman, E.J., Romero, M.F. A novel missense mutation in the sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1/SLC4A4) causes proximal tubular acidosis and glaucoma through ion transport defects. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*: 52238-52246.
- [46] Igarashi, T., Inatomi, J., Sekine, T., Seki, G., Shimadzu, M., Tozawa, F., Takeshima, Y., Takumi, T., Takahashi, T., Yoshikawa, N., Nakamura, H., Endou, H. Novel nonsense mutation in the Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter gene (SLC4A4) in a patient with permanent isolated proximal renal tubular acidosis and bilateral glaucoma. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2001**, *12*: 713-718.
- [47] Soleimani, M., Burnham, C.E. Physiologic and molecular aspects of the Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter in health and disease processes. *Kidney Int.* **2000**, *57*: 371-384.
- [48] Romero, M.F., Boron, W.F. Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **1999**, *61*: 699-723.
- [49] Warth, R., Barrière, H., Meneton, P., Bloch, M., Thomas, J., Tauc, M., Heitzmann, D., Romeo, E., Verrey, F., Mengual, R., Guy, N., Bendahhou, S., Lesage, F., Poujeol, P., Barhanin, J. Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*: 8215-8220.
- [50] Doby, D.C., Bulger, R.E. Renal carbonic anhydrase. *Am. J. Physiol.* **1982**, *243*: 311-324.
- [51] Brenes, L.G., Brenes, J.N., Hernandez, M.M. Familial proximal renal tubular acidosis. A distinct clinical entity. *Am. J. Med.* **1977**, *63*: 244-252.
- [52] Lemann, J. Jr., Adams, N.D., Wilz, D.R., Brenes, L.G. Acid and mineral balances and bone in familial proximal renal tubular acidosis. *Kidney Int.* **2000**, *58*: 1267-1277.
- [53] Katzir, Z., Dinour, D., Reznik-Wolf, H., Nissenkorn, A., Holtzman, E. Familial pure proximal renal tubular acidosis- a clinical and genetic study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2008**, *23*: 1211-1215.
- [54] Hanukoglu, A. Type I pseudohypoaldosteronism includes two clinically and genetically distinct entities with either renal or multiple target organ defects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1991**, *73*: 936-944.
- [55] Rossler, A. The natural history of salt-wasting disorders of adrenal and renal origin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1984**, *59*: 689-700.
- [56] Gamba, G. WNK lies upstream of kinases involved in regulation of ion transporters. *Biochem. J.* **2005**, *391*: e1-e3.
- [57] Gamba, G. Role of WNK kinases in regulating tubular salt and potassium transport and in the development of hypertension. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2005**, *288*: F245-F252.
- [58] Kahle, K.T., Wilson, F.H., Lifton, R.P. Regulation of diverse ion transport pathways by WNK4 kinase: a novel molecular switch. *Trends. Endocrinol. Metab.* **2005**, *16*: 98-103.
- [59] Wilson, F.H., Disse-Nicodème, S., Choate, K.A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D.V., Lipkin, G.W., Achard, J.M., Feely, M.P., Dussol, B., Berland, Y., Unwin, R.J., Mayan, H., Simon, D.B., Farfel, Z., Jeunemaitre, X., Lifton, R.P. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* **2001**, *293*: 1007-1112.

3 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo foi detectar as alterações genéticas em quatro crianças, de duas famílias não relacionadas, com diagnóstico confirmado de ATR distal acompanhados na Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas (UNP-HC) da UFMG, assim como identificar novos genes relacionados às alterações de transporte tubular desses pacientes.

1.2 Objetivos Específicos

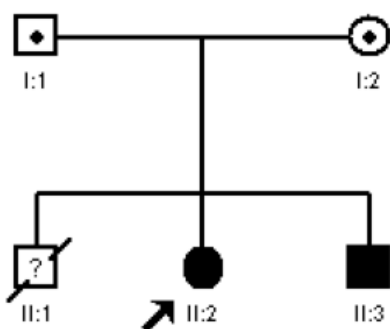
- Rastrear as mutações que possam estar associadas à acidose tubular renal através da técnica de *whole-exome sequencing*;
- Caraterizar as alterações moleculares encontradas;
- Estabelecer relação entre os achados moleculares e as características clínicas dos pacientes estudados.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Para o presente estudo foram selecionadas quatro crianças, de duas famílias não relacionadas, com diagnóstico confirmado de ATR distal (figura 3 - A e B) e acompanhadas na UNP-HC da UFMG. A primeira família (família 1) era composta por 2 irmãos (um do sexo masculino) com ATR distal sem surdez e seus pais saudáveis. A segunda família (família 2) consistia de 2 irmãs gêmeas monozigóticas diagnosticadas com ATR distal e surdez neurosensorial precoce, além de sua mãe não afetada; pai desconhecido. Todos os pacientes foram submetidos a avaliação clínica periódica, segundo protocolo pré estabelecido pela unidade, incluindo acompanhamento nutricional, exames laboratoriais, ultrassonografia e análise genética.

A)



B)

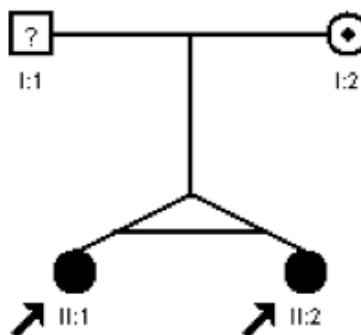


Figura 3 - Pedigrees das famílias do estudo. A) Pedigree da família 1. B) Pedigree da família 2. A seta indica o caso índice.

4.2 Metodologia

4.2.1 Coleta de sangue periférico e extração de DNA

Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram submetidos a punção intravenosa para coleta de 5 a 10mL de sangue periférico através de procedimento padrão, em tubos de vácuo com EDTA, após obter consentimento por escrito. A coleta do material foi realizada na UNP-HC da UFMG durante as consultas de rotina.

O DNA genômico foi extraído utilizando o Qiamp Blood DNA mini Kit (Qiagen, Milano, Italy) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram checadas quanto ao controle de qualidade de pureza através do espectrofotômetro Nandrop (Thermo Scientific, Waltham, MA). As amostras de DNA foram depois armazenadas a -20 °C até seu uso.

4.2.2 Sequenciamento por Genoma Inteiro (Whole-exome Sequencing - WES)

A captura do exoma, seu seqüenciamento e a detecção das variantes foram realizados no centro de análises genômicas da Universidade Yale (Center for Genomic analysis - YCGA).

Para a realização da técnica de seqüenciamento de éxons por genoma inteiro ou whole-exome sequencing (WES) as amostras foram agrupadas em forma de *pool* de DNA de acordo com as características fenotípicas dos pacientes. O primeiro *pool* continha o DNA dos irmãos com ATR distal sem surdez e o segundo, o DNA das irmãs gêmeas com ATR distal associada a surdez neurosensorial.

As amostras agrupadas de DNA de sangue periférico, após quantificadas e normalizadas, foram enriquecidas de éxons e hibridizadas utilizando-se o array Nimble Gen Seq Cap EZ Exome (Roche/Nimblegen SeqCap EZ Human Exome Library v2.0). Antes de proceder a etapa de amplificação, as amostras foram fragmentadas aleatoriamente para que todo o genoma fosse coberto de maneira uniforme. Estes

fragmentos foram então amplificados por ciclos de PCR com o objetivo gerar milhares de cópias de cada fragmento de DNA produzido.

O sequenciamento foi realizado pela plataforma Illumina HiSeq 2000 (Illumina®, San Diego, CA) onde o primeiro ciclo consistiu na incorporação de nucleotídeos com fluorescência, seguido de emissão de laser de alta resolução para a leitura da primeira base de cada agrupamento. As seqüências foram lidas no sentido senso (forward) e no sentido reverso (reverse). A identificação da base foi feita com auxílio de um algoritmo que faz a transformação do sinal de luz em nucleotídeos. O resultado do sequenciamento foi expresso em números. Estes números foram convertidos em um arquivo no formato de texto onde letras são utilizadas para representar as seqüências de nucleotídeos.

4.2.3 Análise do Sequenciamento por WES

O genoma sequenciado foi comparado a um genoma de referência (hg19/NCBI) com o objetivo de detectar possíveis variantes na seqüência de nucleotídeos ou pequenas inserções/deleções.

Como a técnica de WES produz uma quantidade enorme de informações, algumas estratégias para priorização de genes candidatos foram utilizadas identificando, dessa maneira, as regiões do exoma com maior probabilidade de associação com o desenvolvimento da ATR distal.

Foram excluídas as variantes que identificavam mutações silenciosas, ou seja, aquelas sem potencial para modificar a expressão protéica. Foram também excluídas variantes presentes nas regiões não codificantes (UTR - untranslated region), intergênicas e intrônicas. Além disso, as variações com baixa qualidade de leitura, escore de qualidade inferior a 20, também foram eliminadas. Utilizamos o escore PhyloP para identificar variantes com elevado grau de conservação evolutiva e, portanto, com maior probabilidade de resultar em alterações patológicas.

Conseqüentemente, foram excluídas variantes com escore PhyloP inferior a 3. Os genes candidatos foram ainda avaliados quanto a sua função na célula.

O resultante, após análise e seleção, foi inspecionado visualmente utilizando o programa Integrative Genomics Viewer (IGV versão 2.3, <http://www.broadinstitute.org/igv/>).

4.2.4 Estudo estrutural das alterações encontradas

O estudo estrutural das mutações encontradas foi realizado através do alinhamento de sequências de DNA e de proteínas pelos softwares MultAlin e ClustalW respectivamente.

Para prever o efeito da substituição de um aminoácido na função biológica de uma determinada proteína e avaliar o potencial efeito deletério e patogênico das mutações identificadas no resultante protéico utilizamos os escores PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e Provean (Protein Variation Effect Analyzer, <http://provean.jcvi.org/index.php>).

4.2.5 Validação dos Resultados: amplificação e sequenciamento das amostras

As etapas de processamento das amostras, validação e interpretação dos resultados foram realizadas no laboratório de Medicina Molecular, INCT, UFMG.

Para confirmar e validar os resultados, o DNA de cada paciente e de seus familiares foi analisado pelo método de sequenciamento de Sanger.

Um conjunto de iniciadores ou primers (tabela 1) específicos para a amplificação dos exons selecionados dos genes alvo foram desenhados através do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e conferidos manualmente pela análise da sequência disponível no banco de dados do Ensembl (<http://www.ensembl.org>).

Gene	Exon	Primer	Tamanho (bp)
<i>ATP6V1B1</i>	E12	5' TTGACCCCTCGGAATGTAGG 3'	238bp
		5' CCGGACCCTCTTCTCCTTAC 3'	
<i>ATP6V0A4</i>	E13	5' ATGCAAATCGTGGAGCTGTG 3'	264bp
		5' ATGAATCAGGGCAAGACGGT 3'	

Tabela 1 - Primers para amplificação genômica e análise de mutações para os genes *ATP6V1B1* e *ATP6V0A4*.

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria e depois diluído a 50 ng/ μ L para as reações em cadeia da polimerase (PCR). A reação padrão de PCR utilizada seguiu os parâmetros: 100ng de DNA, 2.5 μ L de Tampão IIB 10x (NaCl 40mM; Tris-HCl 10mM, pH 8; Triton X-100 0.1%; MgCl₂ 1.5mM), 2.5 μ L de dNTPs (0.2mM), 0.5 μ L de cada par de iniciadores (10pmol/mL) e 0.5 μ L de Taq DNA polimerase (0.625U). Os produtos foram amplificados em termociclador, utilizando as seguintes etapas: desnaturação a 94 °C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento que variou entre 55 e 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Ao término dos ciclos, as reações passaram por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram purificados com o kit de purificação Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI) e depois visualizados em gel de poliacrilamida 6,5%. O protocolo de coloração envolveu uma etapa de fixação em ácido acético 10%, lavagem em água destilada por 3 minutos, impregnação em solução de nitrato de prata (10,5g AgNO₃, q.s.p 100mL H₂O, formaldeído 37%, q.s.p 50mL de água destilada), lavagem em água destilada e uma etapa de revelação em solução de carbonato de sódio (3g de NaCO₃, q.s.p 100mL

H₂O, 75mL de formaldeído 100% e 20mL de tiosulfato de sódio 10mg/mL). Para as reações de sequenciamento foi utilizado o BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit, seguindo as instruções do fabricante (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). As sequências foram obtidas no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer 4 capillaries (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) e analisadas utilizando-se o programa Sequencher v.4.9.

4.3 Aspectos Éticos

Esta linha de pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), conforme o parecer número 144/02, em anexo (vide anexo 1).

Ressalta-se ainda que somente os pesquisadores envolvidos no projeto tiveram acesso aos dados, ficando assim garantida a confidencialidade das informações obtidas.

Os resultados da pesquisa se destinam única e exclusivamente ao interesse científico, sendo mantido o anonimato do paciente participante da pesquisa. Os resultados obtidos não foram utilizados para outros fins senão os estritamente relacionados aos objetivos do projeto.

5 RESULTADOS: ANÁLISE GENÉTICA (ARTIGO 2)

Whole-exome sequencing as an useful tool for the genetic diagnosis of distal renal tubular acidosis

Whole-exome sequencing as an useful tool for the genetic diagnosis of distal renal tubular acidosis

Paula Cristina de Barros Pereira, Flavia Marques de Melo, Luiz Armando De Marco, Eduardo Araújo Oliveira, Debora Marques de Miranda, Ana Cristina Simões e Silva

Correspondent author: Ana Cristina Simões e Silva / acssilva@hotmail.com

ABSTRACT

Distal renal tubular acidosis (dRTA) is characterized by metabolic acidosis due to impaired renal acid excretion. We selected two unrelated families in a total of four children with dRTA and their parents, to perform whole-exome sequencing. Hearing was preserved in both children from family one, but not from family two, wherein a twin pair had severe deaf. We perform a whole exome sequencing in two pooled samples and confirm findings with Sanger Sequencing method. Two mutations were identified in the *ATP6V0A4* and *ATP6V1B1* genes. A novel mutation in exon 13 of *ATP6V0A4* gene and a mutation in exon 12 of *ATP6V1B1* gene were described. In this study we show the use of whole-exome sequencing and discuss how it may improve these children health care, especially because, besides of being a Mendelian disorder, dRTA is rare and has a complex inheritance.

Our 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, we clearly show the application of this molecular method also in renal tubular diseases.

Key words: distal renal tubular acidosis. whole-exome. children. *ATP6V0A4*. *ATP6V1B1*

INTRODUCTION

Distal renal tubular acidosis (dRTA) is a rare and complex renal disease due to a defect in the excretion of acid load (H^+ and ammonium ions) in alpha-intercalated cells of the collecting duct. The acid load accumulation in the distal nephron results in consumption and reduction of the bicarbonate/ CO_2 buffer in blood (1). The main clinical features of dRTA are vomiting, diarrhea and/or constipation, loss of appetite, polydipsia and polyuria. Chronic acidosis and secondary alterations as vomiting, polyuria and dehydration, affect growth leading to failure to thrive. Ultrasound studies can show nephrocalcinosis and/or nephrolithiasis (2). In general, dRTA has good prognosis if it is diagnosed at an early age and alkaline treatment is continued. Untreated, dRTA causes growth retardation and rickets in children and osteomalacia in adults. Deterioration of renal function can occur over the years (3).

Distal RTA can be transmitted as either an autosomal dominant or an autosomal recessive trait (4). Autosomal dominant phenotype typically courses mildly in adolescence or adulthood (4); one parent suffers and is the carrier of the disease or it is due to *de novo* mutation. Mutations in the *SLC4A1* gene in families with autosomal dominant dRTA have been identified (2,5,6). The symptoms in the autosomal recessive phenotype predominantly appear at infancy or early childhood in which growth retardation is very common. This variant can occur with or without deafness and parents are not affected (2). Autosomal recessive dRTA is associated with mutations in any of the following genes: *SLC4A1* (7), *ATP6V0A4* and *ATP6V1B1* (2,8). Individuals without hearing defects usually carry mutations in the *ATP6V0A4* gene, while the ones with deafness have *ATP6V1B1* gene mutations. In approximately 20% of the patients with dRTA no mutations were found in any of these related genes (3). Indeed, there are dRTA patients with deafness without *ATP6V1B1* gene mutations, and others with normal hearing who do not have *ATP6V0A4* gene mutations (3). These findings suggest that other transporters or channels might cause dRTA. In terms of complexity, it is known that some patients

with mutations in the gene *ATP6V0A4* develop deafness only at the second decade of life. Therefore, much has to be elucidated in terms of phenotype-genotype correlations (8-10). So far, more than 20 mutations in *ATP6V0A4* are already known.

Whole-exome sequencing provides coverage of more than 95% of the exons, which contains 85% of disease-causing mutations in Mendelian disorders and many disease-predisposing single nucleotide polymorphisms (SNPs) throughout the genome (11,12). Whole-exome sequencing is interesting to evaluate the disease pathogenesis and to recognize new pathogenic genes or mutations associated to disorder, special in Mendelian disorders (11,12). In this regard, this study aimed to characterize the usefulness of whole exome sequencing for genetic evaluation of two brazilian families with dRTA.

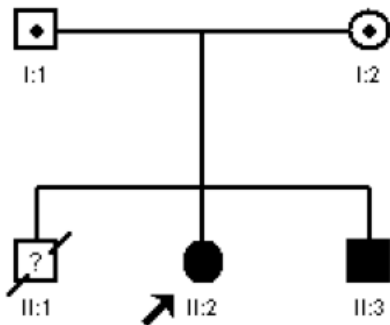
PATIENTS AND METHODS

Subjects and Clinical Assessment

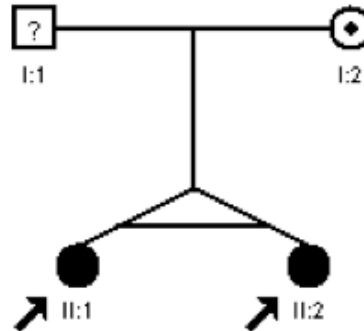
Four children with confirmed dRTA from two unrelated families were selected for this study (**Figure 1 - A and B**). All patients have been followed up at the Pediatric Nephrology Unity from Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil. The first family (family one) consisted of two affected siblings, with dRTA but without deafness, and their unaffected parents. The second family (family two) had a monozygotic twin pair, diagnosed with dRTA and nerve deafness, and their healthy mother; the father is unknown. All patients were submitted to a systematic protocol including clinical and nutritional evaluation, laboratory measurements, renal ultrasonography and genetic analysis. Informed consent, approved by the institutional review boards at UFMG, was obtained from all participants; in case of children, also from their parents and/or legal guardian.

Figure 1 - Pedigrees of the families from the study. A) The pedigree of family one. **B)** The pedigree of family two. The arrow indicates the proband.

A)



B)



DNA extraction

Genomic DNA was extracted from 5 mL of dRTA patients and their parent's peripheral blood, using Qiaamp Blood DNA mini Kit (Qiagen, Milano, Italy) according to the manufacturer's instructions. All samples were quality control checked for purity using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA). DNA samples were stored at -20 °C until usage.

Whole exome sequencing

Exome sequencing was performed on two pools of samples to optimize the results. Samples were pooled considering the clinical features of the patients. The first pool had DNA from the two siblings with dRTA without deafness and the second one, from the twin sisters with dRTA associated with deafness. Array capture was used to isolate the relevant human genes (Roche/Nimblegen SeqCap EZ Human Exome Library v2.0) and these genes were sequenced on the Illumina HiSeq 2000 platform.

Filtering data

The main following steps were taken to prioritize the high-quality variants: (i) variants within intergenic, intronic, and UTR regions and synonymous mutations were excluded from downstream analysis; (ii) variants with quality score minor than 20 were excluded; (iii) only the conservation score (phyloP) from comparison of human and 43 vertebrates higher than 3 were consider; (iv) After this prior selection, the remained genes were filtered by the function. Possible impacts of variants were predicted by Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). The final set of selected variants was visually inspected using Integrative Genomics Viewer (IGV) (13). Previously described polymorphic variants in public data were investigated and compared with the variations found in the current exome. The selected mutations to be investigated in each group of this study were not found in previous exomes (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

Validation of data

Polymerase chain reaction (PCR) Sanger sequencing was used in the analysis to confirm the data. All patients and their parents were submitted to the PCR. Amplification products of appropriate size were identified using polyacrylamide gel electrophoresis. Products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Milano, Italy) and then submitted to sequencing reaction using both forward and reverse primers with the ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 on an ABI PRISM 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Each read was aligned to the reference sequence, and mutations were identified with the Sequencer software (GeneCodes, Ann Arbor, MI). All primers were designed using the online tool Primer3 (**Table 1**).

Table 1 - Primers for genomic amplification and mutational analysis of *ATP6V1B1* and *ATP6V0A4* genes.

Gene	Exon	Primer	Product Size (bp)
<i>ATP6V1B1</i>	E12	5' TTGACCCCTCGGAATGTAGG 3'	238bp
		5' CCGGACCCTCTTCTCCTTAC 3'	
<i>ATP6V0A4</i>	E13	5' ATGCAAATCGTGGAGCTGTG 3'	264bp
		5' ATGAATCAGGGCAAGACGGT 3'	

Structural studies of mutations

Protein and DNA sequence alignments were performed using the ClustalW and the Multalin softwares, respectively. The prediction of amino acid substitution on the biological function of the protein was evaluated using both PolyPhen-2 and Provean softwares (<http://provean.jcvi.org> and <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, respectively).

RESULTS

dRTA without deafness

This family consisted of two siblings, a 13 year old girl and her 7 year old brother, with well defined dRTA. The girl was the proband, diagnosed with dRTA at the age of 3 months. The initial findings were failure to thrive, hyperchloremic metabolic acidosis with abnormally high urine pH (7.0), normal blood venous pH (7.46), normal glomerular filtration rate and nephrocalcinosis. The boy was diagnosed at his first month of life after a severe dehydration with metabolic acidosis, hypokalemia, transient elevation of serum creatinine and hypocalcemia. His first renal ultrasonography showed bilateral nephrocalcinosis. Tables 2 and 3 summarize the clinical and biochemical manifestations at baseline leading to the diagnosis of dRTA in each patient. The parents were unaffected and had an older child that died by the age of 4 months with similar symptoms.

Table 2 - Clinical features at baseline of the two siblings with dRTA without deafness.

Patients	Age	Sex	BW (g)	Weight (g)	Height (cm)	NC	ND	Initial manifestations
II.2	4 months	female	NA	3,960	54.5	Yes	No	Failure to thrive, dehydration
II.3	1 month	male	3,450	3,760	50	Yes	No	Vomiting and dehydration

Roman numerals indicate the family position on the pedigree; BW- Birth weight; NC - Nephrocalcinosis; ND - Nerve Defness; NA - Not Avaiable

Table 3 - Biochemical features at baseline of the two siblings with dRTA without deafness.

Patients	S Cr (mg/dl)	Blood Venous pH	S HCO ₃ ⁻ (mg/dl)	S K (mEq/l)	S Cl (mEq/l)	UpH
II.2	0.4	7.46	19.0	3.8	118	7.5
II.3	1.7	7.13	8.0	2.0	109	7.1

S: serum; Cr: creatinine; UpH: urinary pH

Whole-exome sequencing conducted in this group generated 3577 single nucleotide variations (SNVs) and 416 small insertions and deletions (INDELs). Filtering for variants were applied to select the candidate gene (**Table 4**).

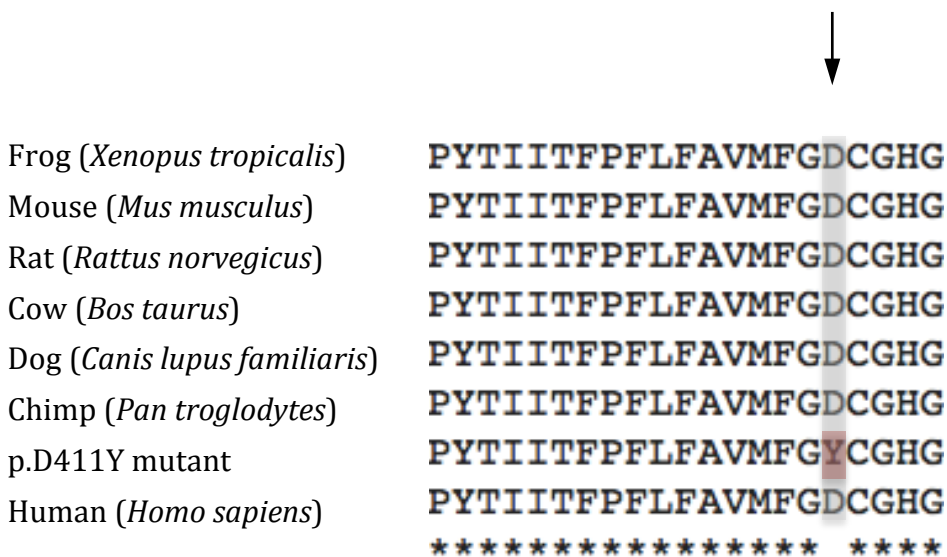
Table 4 - Variant prioritizing for family one.

	Number of Variants
Total Variants	3993
Intergenic, intronic and UTR regions and synonymous mutations were excluded	1445
Quality score <20 were excluded	879
PhyloP <3 were excluded	131
Selection by function	15
PolyPhen <0.7 were excluded	10
Selection using cross-reference gene database and IGV	1
Candidate gene	1

After filtering the exome data, we selected the *ATP6V0A4* gene for study. We observed a single nucleotide change GAC → TAC (c.1232G>T) in the exon 13 that caused an amino acid substitution: aspartic acid to tyrosine in position 411 (p.D411Y). This amino acid change was predicted to be damaging by Provean and PolyPhen-2. This mutation occurs at an evolutionarily conserved amino acid and affects highly preserved residues (**Figure 2**).

Figure 2 - Identification of *ATP6V0A4* missense mutation c.1232G>T, which results in a substitution of an evolutionary conserved residue (p.D411Y).

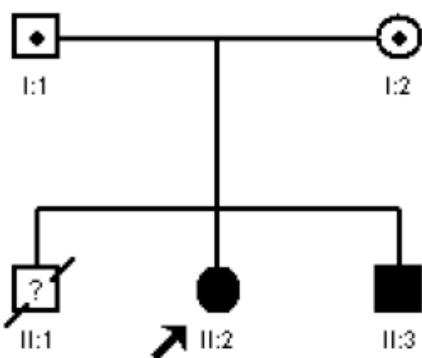
Multiple proteins sequence alignments of *ATP6V0A4* indicating evolutionary conservation of D411. Proteins sequence alignments were performed with the use of ClustalW software.



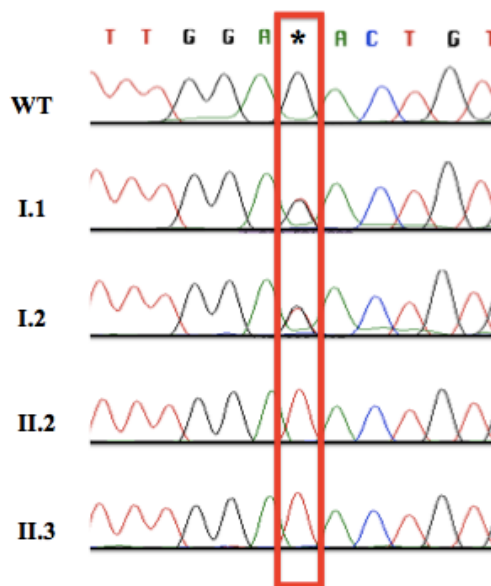
The patients and their parents were submitted to Sanger sequencing by using the designed primer for exon 13 of the *ATP6V0A4* gene. The two siblings presented the same mutation in homozygosis (c.1232G>T) while both parents had a heterozygous trace (**Figure 3 - A and B**). This is a novel autosomal recessive dRTA mutation.

Figure 3 - Pedigree of family one and results of sequencing for c.1232G>T mutation. A) The pedigree shows the affected statuses, individual identifiers, and genotypes at codon 411. The arrow indicates the proband. **B)** DNA sequence chromatograms in which the two affected siblings have homozygous G to T substitution at c.1232. This substitution occurs in heterozygosis in both parents. * Mutated nucleotide.

A)



B)



dRTA with deafness

This family consisted of a twin pair of girls with dRTA in association with nerve deafness. The girls were diagnosed at the age of 2 after a long period treating for rickets and growth retardation only with nutritional support. Clinical and biochemical features at baseline are shown on tables 5 and 6.

Table 5 - Clinical features at baseline of the twin sisters with dRTA and deafness.

Patient s	Age	Sex	BW (g)	Weight (g)	Height (cm)	NC	ND	Initial manifestations
II.1	2 years	female	2,340	15,500	102	no	Yes	Rickets, failure to thrive, growth retardation
II.2	2 years	female	2,300	16,600	105	no	Yes	Rickets, failure to thrive, growth retardation

Roman numerals indicate the family position on the pedigree; BW- Birth weight; NC - Nephrocalcinosis; ND - Nerve Defnes

Table 6 - Biochemical features at diagnosis of the twin sisters with dRTA and deafness.

Patients	S Cr (mg/dl)	Blood Venous pH	S HCO ₃ ⁻ (mg/dl)	S K (mEq/l)	S Cl (mEq/l)	UpH
II.1	0.5	7.23	15.9	4.0	117	7.0
II.2	0.5	7.12	13.7	4.1	123	7.0

S: serum; Cr: creatinine; UpH: urinary pH

Whole-exome sequencing conducted in family two generated 4375 SNVs and 2416 INDELS. After filtering the variants, only one candidate gene remained (**Table 7**).

Table 7 - Variant prioritizing for family two.

	Number of Variants
Total Variants	6791
Intergenic, intronic and UTR regions and synonymous mutations were excluded	1912
Quality score <20 were excluded	1012
PhyloP <3 were excluded	215
Selection by function	14
PolyPhen <0.7 were excluded	6
Selection using cross-reference gene database and IGV	1
Candidate gene	1

We selected, based on the exome data, the *ATP6V1B1* gene as candidate in this group. A homozygous one base-pair insertion (c.1149_1155insC) in exon 12 was detected (**Figure 4A**). The two dRTA twin sisters presented the insertion described. We performed the PCR of their unaffected mother (father unknown). The

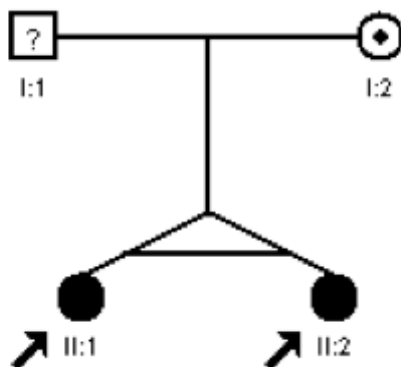
two siblings had the same homozygous mutation, while the mother presented this insertion in heterozygosis (**Figure 4 - B and C**).

Figure 4 - Identification, pedigree of family two and results of sequencing for c.1149_1155insC mutation. A) Identification of the c.1149_1155insC mutation using MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). **B)** The pedigree shows the affection statuses, individual identifiers, and genotypes at c.1149-1155insC. The arrow indicates the probands and the individual with "?" was of uncertain genotype status. **C)** Direct DNA sequence chromatograms of family members in which the two affected siblings have homozygous insertion of a C and the mother has a heterozygous trace, as marked by the red box. WT means wild type.

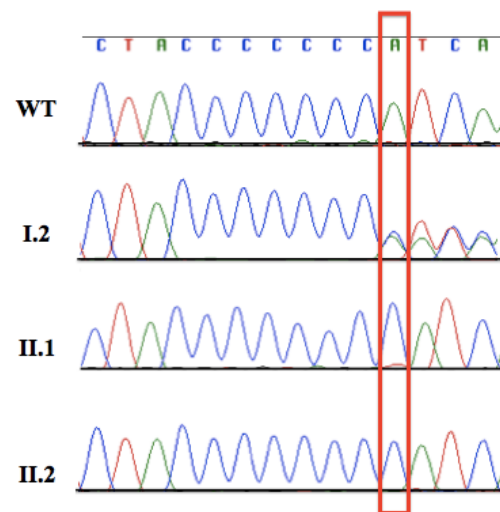
A)

	1145	1155	1164	1174
	-----+-----+-----+-----			
Allele1wt	TCCCTCAGATCTACCCCCC-ATCAACGTGCTCCCTTCCCTGT			
Allele2Ins	TCCCTCAGATCTACCCCCC C ATCAACGTGCTCCCTTCCCTGT			
Consensus	TCCCTCAGATCTACCCCCC . ATCAACGTGCTCCCTTCCCTGT			

B)



C)



DISCUSSION

Several DNA errors are located in exons leading to structural alterations in proteins and functional changes (3). In this way, whole-exome analyzes these exons in a rapid and cost-effective manner, allowing genetic diagnose of complex and monogenic diseases (14,15). In rare disorders, the use of whole-exome minimizes the failure in detecting mutations in hot-spots regions and in comparison to Sanger sequencing is a time saving and cost-effective method. Direct Sanger sequencing is still considered the most accurate method to detect mutations because other gene testing techniques may not detect all sequence variations. The search in a whole-genome basis and the validation of the findings with Sanger sequencing method is an efficient way to determine the genetic causality of a disorder. However, the way this next generation technology will be incorporated to clinical practice is still challenging, since data interpretation are laborious and not easy to distinguish what should be further evaluated in a determined disease (11,12). On the other hand, whole-genome sequencing allows the detection of new mutations, the prediction of genetic risks and the establishment of multigene panels for clinical use, mostly in Mendelian disorders or diseases with known genetic causes (11,12). Recently, even cases without clinical diagnosis could be named after a whole-exome in 25% of 250 cases of undiagnosed suspected genetic disorder (16), showing that in unclear genetic or complex phenotypes this method will be useful to diagnose and to genetics counseling. Thus, in the present study, we hypothesized that the application of whole exome sequencing for genetic diagnosis of dRTA might help to clarify phenotype-genotype correlations in this rare Mendelian disorder.

dRTA is a heterogeneous disorder because it may occur by mutations in more than one gene. Inherited forms of dRTA have three variants: autosomal dominant and autosomal recessive, with or without deafness. Dominant disease typically presents more mildly in adolescence or adulthood and it has been only associated to mutations in the bicarbonate/chloride exchanger (AE1). On the other hand, the recessive variant occurs in infancy or early childhood, in which growth retardation

is very common (4). Autosomal recessive dRTA has been associated with mutations in the genes *ATP6V1B1* and *ATP6V0A4*, which encode the subunits a4 and B1 of the vacuolar-type proton ATPase (V- or H⁺-ATPase), respectively. In addition, mutations in the *SLC4A1* gene, responsible for the expression of AE1 proteins, have been also detected in cases of autosomal recessive dRTA without deafness. All mutations currently identified in patients with dRTA are shown on **Table 8**. Our results demonstrate for the first time the utility of whole-exome sequencing in renal tubular disorders by allowing the identification of one new pathogenic mutation in dRTA. In this way, our study supports the potential applicability of this next generation technology for the diagnosis and clinical approach of dRTA.

Table 8 - dRTA identified mutations.

	GENE (PROTEIN)	MUTATION			REFERENCE
		DNA	Protein	Characteristic	
Dominant dRTA	<i>SLC4A1</i> (AE1)		R589C R598H R598S S609R S613F A888L+889X R901X	Heterozygous	(5; 23; 24)
Recessive dRTA	<i>SLC4A1</i> (AE1)		G701D ΔV850 S773P V488M G701D/SAO ΔV850/SAO A858D/SAO R602H/SAO	Homozygous Compound Heterozygous	(5; 23; 24)
	<i>ATP6V1B1</i> (B1 subunit of the H ⁺ ATPase)	140C>T 91C>T 1149-1155insC* (1152insC) 1152delC IVS2-1 G>C 1086C>G 497delC 242T>C 370C>T 421T>G 823A>C 1937C>G 1090G>A 469C>T 368G>T 1181G>A 988G>A	R29X R31X I386fsX441* (P385PfsX441) P385PfsX395 loss os splice (acceptor site) P344R T166RfsX174 L81P R124W M174R T275P P346R G364S R157C G123V R394Q E330K	Homozygous	(8; 9; 18; 20)

	Intron 2 + 1G>C	Splicing		
	Intron 6 + 1G>A	Splicing		
	Intron 7 + 1G>T	Splicing		
	Intron 8 + 1G>A	Splicing		
	291T>C	L790	Heterozygous	
	1086C>G	P344R		
	1181G>A	R394Q		
	1443G>A	R463H		
	IVS2-1 G>C / 1149-1155insC	loss os splice acceptor site/I386fsX441	Compound Heterozygous	
	1037 C>G / 1149-1155insC	P346R/ I386fsX441		
	947G>A / Intron 9 - 2A>T	G316E / Splicing		
<i>ATP6V0A4</i> (a4 subunit of the H ⁺ ATPase)	1072C>T	Q358X	Homozygous	(8; 18; 20)
	2257C>T	Q753X		
	338delA	N113fsX117		
	709-711delAAG	K237del		
	1346G>A	R449H		
	1506T>A	Y502X		
	306-307insA	L103fsX139		
	1185delC	P395fsX407		
	1832-1833delAGinsT	S611fsX648		
	2420G>A	R807Q		
	387C>A	Y129X		
	2308C>T	R770X		
	IVS6-1G>A	loss of splice (acceptor site)		
	322C>T	Q108X		
	571C>T	R191X		
	2035G>T	D679Y		
	16C>T	R6X		
	828-831delAACA	Q276fsX301		
	198-201delT	F67fsX77		
	2137delG	E713fsX765		
	1232G>T**	D411Y**		
	387C>A / 2257C>T	Y129X / Q753X	Compound Heterozygous	
	187-188delAG / IVS10+1G>A	R63fsX74 / loss of splice(donor site)		
	367G>T / 387C>A	E123X / Y129X		
	337-8delA / 571C>T	N113fsX117 / R191X		

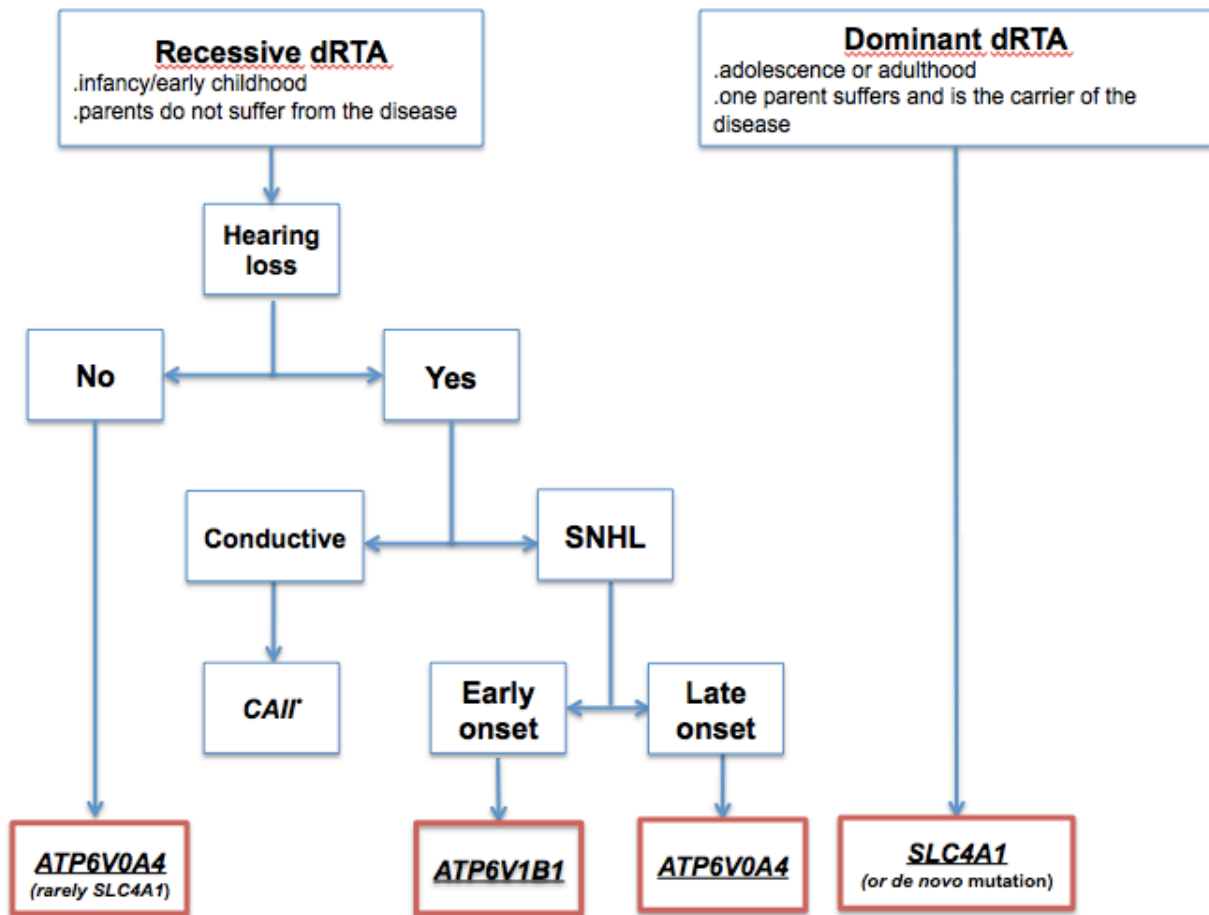
*Mutation found in this study / **Novel mutation found in this study.

The vacuolar-type proton ATPase (V- or H⁺-ATPase) is a pump of multiple subunits that is essential for normal acidification. Two structural domains form this pump: membrane-bound V0 and cytoplasmic or peripheral V1. Each domain comprised multiple subunits (a–e and A–H, respectively), which are responsible for ATP hydrolysis and proton transport, respectively (4). *ATP6V1B1* gene encodes B1 subunit, while *ATP6V0A4* gene encodes a4 subunit. The vacuolar-type proton ATPase is expressed apically on renal α -intercalated cells and also in the cochlea and endolymphatic sac. Indeed, mutations in different subunits of the proton pump that are expressed in kidney and ear tissues can cause tubular defects associated with

deafness (17). Based on the type of hearing loss, the type of mutations can be suspected. Conductive deafness was observed in mutations of the intracellular isoform of carbonic anhydrase (CA), whereas sensorineural hearing loss (SNHL) has been associated with *ATP6V1B1* and *ATP6VOA4* mutations (18-20) . Mutations in the *SLC4A1* gene usually do not have any association with deafness. Therefore, the presence and the kind of deafness are helpful in distinguishing different forms of dRTA (**Figure 5**).

The AE1 proteins, encoded by the *SLC4* family of genes present on chromosome 17 q21-22 (21), are expressed on the erythrocyte plasma membrane and the basolateral membrane of the kidney α -intercalated cells (22). Because of the expression of AE1 in two different cells with distinct functions, AE1 mutations show pleiotropic effects resulting in two distinct and seemingly unrelated phenotypes: hereditary spherocytosis (or other forms of erythrocyte abnormalities as the Southeast Asian ovalocytosis - SAO) and dRTA (4). To date, 11 mutations of *SLC4A1* have been related to dRTA, in addition to ovalocytosis or spherocytosis (23). Those mutations have been found mostly in the Asian population (24).

Figure 5 – Schematic view of target genes in dRTA.



* Carbonic anhydrase II (mixed dRTA) / SNHL – sensorineural hearing loss

In the two families of this study, the parents were unaffected and dRTA had early onset leading to growth impairment during infancy. Therefore, mutations in the *SLC4A1* gene (AE1 proteins) were highly unlikely in our patients. In family one, exome sequencing identified a novel homozygous mutation in the *ATP6V0A4* gene. Based on previous reports (10) and on our clinical and biochemical features, this gene was selected as a potential candidate to search for mutations, since no hearing loss was detected in the affected patients. The twin girls of family two had sensorineural hearing loss and early onset symptoms of dRTA. The phenotypes together with the whole exome data led us to investigate the *ATP6V1B1* gene.

Accordingly, we found a previously described mutation (9), which was also confirmed by Sanger sequencing.

Figure 4 shows the potential candidate genes associated with dRTA based on phenotype characteristics. It should be pointed, however, that *ATP6V1B1* or *ATP6VOA4* gene mutations were not found in some families with primary recessive forms of dRTA. There are numerous other candidate genes for recessive dRTA (25), especially those genes related to the proton transporters. In this regard, the use of whole-exome sequencing together with the phenotype emerges as useful tool for the discovery of new mutations and genetic alterations in this complex and rare disease.

In summary, whole exome sequencing proved to be a fast and successful method for identifying novel and recurrent mutations in genetic forms of dRTA. To determine which genetic variants are potentially causative of renal tubular transport alterations is still a challenge, especially in recessive forms dRTA, in which mutations can occur in more than one gene. In the near future, whole exome sequencing will allow the genetic diagnosis of rare diseases at clinical practice.

REFERENCES

1. Rodríguez Soriano J. Renal tubular acidosis: The clinical entity. *J Am Soc Nephrol* 2002, Aug;13(8):2160-70.
2. Fry AC, Karet FE. Inherited renal acidoses. *Physiology (Bethesda)* 2007, Jun;22:202-11.
3. Escobar L, Mejía N, Gil H, Santos F. Distal renal tubular acidosis: A hereditary disease with an inadequate urinary H⁺ excretion. *Nefrologia* 2013;33(3):289-96.
4. Pereira PCB, Miranda DM, Oliveira EA, Simões e Silva AC. Molecular pathophysiology of renal tubular acidosis. *Current Genomics* 2009;10(1):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. *Journal of Clinical Investigation* 1997;100(7):1693.
6. Karet FE, Gainza FJ, Györy AZ, Unwin RJ, Wrong O, Tanner MJA, et al. Mutations in the chloride-bicarbonate exchanger gene AE1 cause autosomal dominant but not autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95(11):6337.
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 glycophorin A. *Journal of Clinical Investigation* 1998;102(12):2173.
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, May;17(5):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⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat Genet* 1999, Jan;21(1):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, Sep;26(1):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. *Human Mutation* 2013.
12. Rabbani B, Tekin M, Mahdih N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet* 2013, Nov 7.
13. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 2011;29(1):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, Nov 10;106(45):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(10):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, Oct 17;369(16):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, Oct;293(4):C1187-208.
18. Stover EH. Novel *ATP6V1B1* and *ATP6V0A4* mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. *J Med Genet* 2002, Nov 1;39(11):796-803.
19. Batlle D, Haque SK. Genetic causes and mechanisms of distal renal tubular acidosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012;27(10):3691-704.
20. Elhayek D, de Nanclares GP, 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(1):119.
21. Alper SL, Darman RB, Chernova MN, Dahl NK. The AE gene family of Cl/HCO_3^- exchangers. *J Nephrol* 2002;15 Suppl 5:S41-53.
22. Schuster VL. Function and regulation of collecting duct intercalated cells. *Annu Rev Physiol* 1993;55:267-88.
23. Alper SL. Molecular physiology and genetics of Na^+ -independent SLC4 anion exchangers. *J Exp Biol* 2009, Jun;212(Pt 11):1672-83.
24. Cheidde L, Vieira TC, Lima PRM, Saad STO, Heilberg IP. A novel mutation in the anion exchanger 1 gene is associated with familial distal renal tubular acidosis and nephrocalcinosis. *Pediatrics* 2003, Dec;112(6 Pt 1):1361-7.

25. Smith AN, Borthwick KJ, Karet FE. Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H1-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 2002;297:169-77.

6 CONCLUSÃO

A grande importância do estudo da ATR distal encontra-se no impacto causado sobre o crescimento pômdero-estatural das crianças acometidas e não tratadas adequadamente. Outro fator relevante é a dificuldade diagnóstica que, ao retardar o início do tratamento, pode piorar significativamente o prognóstico. Por se tratar de uma doença heterogênea e de herança complexa, a utilização do *whole-exome sequencing* torna-se um método promissor para o estabelecimento do diagnóstico e até mesmo para definição de uma melhor abordagem clínica.

A técnica *whole-exome* permite a detecção de novas mutações, a previsão de riscos genéticos e o estabelecimento de painéis multigênicos para uso clínico, principalmente em desordens mendelianas ou doenças com causas genéticas conhecidas. No entanto, a forma como esta tecnologia de última geração será incorporadas à prática clínica ainda é um desafio, uma vez que a interpretação dos dados é trabalhosa e complexa.

Em nosso estudo, duas famílias de pacientes com ATR distal foram analisadas através da técnica de *whole-exome*. Duas mutações foram encontradas, sendo que uma dessas mutações ainda não havia sido descrita anteriormente. Existem diversos estudos clínicos e genéticos com pacientes portadores de ATR distal, porém, até o momento, nenhum deles utilizou-se desta técnica como abordagem inicial. Não há nenhum relato na literatura de utilização da técnica de *whole-exome* como ponto de partida para caracterização genética de pacientes com ATR distal.

Desta forma, nosso estudo corrobora a aplicabilidade potencial da técnica de *whole-exome* para o diagnóstico genético não só da ATR distal como também de outras doenças tubulares renais. A utilização do *whole-exome* poderá auxiliar na compreensão da patogênese das alterações do transporte tubular renal, contribuindo, num futuro próximo, para a abordagem clínica dos pacientes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Escobar L, Mejía N, Gil H, Santos F. Distal renal tubular acidosis: A hereditary disease with an inadequate urinary H⁺ excretion. *Nefrologia* 2013;33(3):289-96.
2. Pirojsakul K, Tangnararatchakit K, Tapaneya-Olarn W. Clinical outcome of children with primary distal renal tubular acidosis. *J Med Assoc Thai* 2011, Oct;94(10):1205-11.
3. Troels R, Frische S, Nielsen S. Clinical review: Renal tubular acidosis – a physicochemical approach. *Critical Care* 2005;9:573-80.
4. Bajpai A, Bagga A, Hari P, Bardia A, Mantan M. Long-term outcome in children with primary distal renal tubular acidosis. *Indian Pediatr* 2005, Apr;42(4):321-8.
5. Rodríguez Soriano J. Renal tubular acidosis: The clinical entity. *J Am Soc Nephrol* 2002, Aug;13(8):2160-70.
6. Silva ACS, Lima JCA, Souto MFO. Acidose tubular renal em pediatria:[Revisão]; renal tubular acidosis in pediatrics:[Review]. *J. Bras. Nefrol* 2007;29(1):38-47.
7. Simões e Silva AC, Miranda DM, Pereira PCB. Doenças tubulares renais. In: Leão, Corrêa EJ, Viana MB, de Vasconcelos MC, Mota JAC, editors. *Pediatria Ambulatorial*. Belo Horizonte: COOPMED; 2013. p. 929-38.
8. Wagner CA, Geibel JP. Acid-base transport in the collecting duct. *J Nephrol* 2002;15 Suppl 5:S112-27.
9. Zelikovic I. Molecular pathophysiology of tubular transport disorders. *Pediatr Nephrol* 2001, Nov;16(11):919-35.
10. Nash MA, Torrado AD, Greifer I, Spitzer A, Edelmann CM. Renal tubular acidosis in infants and children. Clinical course, response to treatment, and prognosis. *J Pediatr* 1972, May;80(5):738-48.
11. Rodriguez-Soriano J, Vallo A, Castillo G, Oliveros R. Natural history of primary distal renal tubular acidosis treated since infancy. *J Pediatr* 1982, Nov;101(5):669-76.

12. Santos F, Chan JC. Renal tubular acidosis in children. Diagnosis, treatment and prognosis. *Am J Nephrol* 1986;6(4):289-95.
13. Caruana RJ, Buckalew VM. The syndrome of distal (type 1) renal tubular acidosis. Clinical and laboratory findings in 58 cases. *Medicine (Baltimore)* 1988, Mar;67(2):84-99.
14. Caldas A, Broyer M, Dechaux M, Kleinknecht C. Primary distal tubular acidosis in childhood: Clinical study and long-term follow-up of 28 patients. *J Pediatr* 1992, Aug;121(2):233-41.
15. Pereira PCB, Miranda DM, Oliveira EA, Simões e Silva AC. Molecular pathophysiology of renal tubular acidosis. *Current Genomics* 2009;10(1):51-9.
16. Rodríguez-Soriano J. New insights into the pathogenesis of renal tubular acidosis--from functional to molecular studies. *Pediatr Nephrol* 2000, Oct;14(12):1121-36.
17. Fry AC, Karet FE. Inherited renal acidoses. *Physiology (Bethesda)* 2007, Jun;22:202-11.
18. Stewart PA. Modern quantitative acid-base chemistry. *Can J Physiol Pharmacol* 1983, Dec;61(12):1444-61.
19. Corey HE, Vallo A, Rodríguez-Soriano J. An analysis of renal tubular acidosis by the stewart method. *Pediatr Nephrol* 2006, Feb;21(2):206-11.
20. Hemstreet BA. Antimicrobial-associated renal tubular acidosis. *Ann Pharmacother* 2004, Jun;38(6):1031-8.
21. Pessler F, Emery H, Dai L, Wu Y-M, Monash B, Cron RQ, Pradhan M. The spectrum of renal tubular acidosis in paediatric sjögren syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2006, Jan;45(1):85-91.
22. Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel JP. Renal vacuolar H⁺-atpase. *Physiol Rev* 2004, Oct;84(4):1263-314.
23. Breton S, Brown D. Regulation of luminal acidification by the v-atpase. *Physiology (Bethesda)* 2013, Sep;28(5):318-29.
24. Beyenbach KW, Wieczorek H. The v-type H⁺ atpase: Molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* 2006, Feb;209(Pt 4):577-89.

25. Schofield AE, Martin PG, Spillet D, Tanner MJ. The structure of the human red blood cell anion exchanger (EPB3, AE1, band 3) gene. *Blood* 1994;84(6):2000-12.
26. Sahr KE, Taylor WM, Daniels BP, Rubin HL, Jarolim P. The structure and organization of the human erythroid anion exchanger (AE1) gene. *Genomics* 1994, Dec;24(3):491-501.
27. Murador P, Deffune E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2007;29(2):168-78.
28. 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. *Journal of Clinical Investigation* 1997;100(7):1693.
29. Yenchitsomanus P-T, Kittanakom S, Rungroj N, Cordat E, Reithmeier RAF. Molecular mechanisms of autosomal dominant and recessive distal renal tubular acidosis caused by SLC4A1 (AE1) mutations. *J Mol Genet Med* 2005;1(2):49-62.
30. Sinha R, Agarwal I, Bawazir WM, Bruce LJ. Distal renal tubular acidosis with hereditary spherocytosis. *Indian Pediatr* 2013, Jul;50(7):693-5.
31. Batlle D, Haque SK. Genetic causes and mechanisms of distal renal tubular acidosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012;27(10):3691-704.
32. Cheidde L, Vieira TC, Lima PRM, Saad STO, Heilberg IP. A novel mutation in the anion exchanger 1 gene is associated with familial distal renal tubular acidosis and nephrocalcinosis. *Pediatrics* 2003, Dec;112(6 Pt 1):1361-7.
33. Ring T, Frische S, Nielsen S. Clinical review: Renal tubular acidosis - a physicochemical approach. *Crit Care* 2005;9(6):573-80.
34. Elhayek D, de Nanclares GP, 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(1):119.
35. 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, Oct;293(4):C1187-208.
36. Mohebbi N, Vargas-Poussou R, Hegemann SCA, Schuknecht B, Kistler AD, Wüthrich RP, Wagner CA. Homozygous and compound heterozygous mutations in

the *ATP6V1B1* gene in patients with renal tubular acidosis and sensorineural hearing loss. *Clin Genet* 2013, Mar;83(3):274-8.

37. Smith AN, Borthwick KJ, Karet FE. Molecular cloning and characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H1-ATPase C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *Gene* 2002;297:169-77.

38. Stover EH. Novel *ATP6V1B1* and *ATP6V0A4* mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. *J Med Genet* 2002, Nov 1;39(11):796-803.

39. Moe OW, Berry CA, Ives HE, Rector Jr FC. Renal transport of glucose, amino acids, sodium, chloride, and water. In: *The Kidney*. WB Saunders Company Philadelphia; 2000. p. 375-415.

40. Smulders YM, Frissen PH, Slaats EH, Silberbusch J. Renal tubular acidosis. Pathophysiology and diagnosis. *Arch Intern Med* 1996;156(15):1629-36.

41. Zawadzki J. Permeability defect with bicarbonate leak as a mechanism of immune-related distal renal tubular acidosis. *Am J Kidney Dis* 1998, Mar;31(3):527-32.

42. Eiam-Ong S, Dafnis E, Spohn M, Kurtzman NA, Sabatini S. H-K-ATPase in distal renal tubular acidosis: Urinary tract obstruction, lithium, and amiloride. *Am J Physiol* 1993, Dec;265(6 Pt 2):F875-80.

43. DuBose JR TD. Acid-base disorders. In: *Brenner & Rector's The Kidney*. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2000. p. 925-97.

44. Bresolin NL, Grillo E, Fernandes VR, Carvalho FLC, Goes JEC, da Silva RJM. A case report and review of hypokalemic paralysis secondary to renal tubular acidosis. *Pediatr Nephrol* 2005, Jun;20(6):818-20.

45. Diagnosis and treatment of renal tubular disorders; *Semin nephrol*. 1998.

46. Morris RC, Sebastian A. Alkali therapy in renal tubular acidosis: Who needs it? *J Am Soc Nephrol* 2002, Aug;13(8):2186-8.

47. Domrongkitchaiporn S, Pongskul C, Sirikulchayanonta V, Stitchantrakul W, Leeprasert V, Ongphiphadhanakul B, et al. Bone histology and bone mineral density

after correction of acidosis in distal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2002, Dec;62(6):2160-6.

48. Domrongkitchaiporn S, Khositseth S, Stitchantrakul W, Tapaneya-olarn W, Radinahamed P. Dosage of potassium citrate in the correction of urinary abnormalities in pediatric renal tubular acidosis patients. *Am J Kidney Dis* 2002, Feb;39(2):383-91.

49. Guimarães PMGM, Santos DJS, Moreira GMM, Barbosa CR, De Oliveira SMF, Guimarães PM. Excreção urinária de cálcio, ácido úrico e citrato em crianças e adolescentes saudáveis. *J Pediatr (Rio J)* 2002;78.

50. Coe FL, Parks JH, Asplin JR. The pathogenesis and treatment of kidney stones. *New England Journal of Medicine* 1992;327(16):1141-52.

51. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet* 2013, Nov 7.

52. 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, Oct 17;369(16):1502-11.

8 ANEXOS

8.1 Parecer do COEP (comitê de ética em pesquisa)/ UFMG



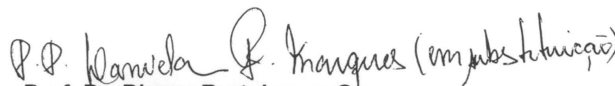
Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de ética em pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº 144/02


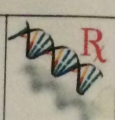
Interessadas: Prof^a. Dra. Ana Cristina Simões e Silva e
Critiane Jeannette Crosara Horta
Depto de Pediatria - FM/UFMG

Voto:

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou no dia 04 de setembro de 2002 o projeto de pesquisa intitulado « **Estudo das disfunções tubulares em crianças e adolescentes acompanhados pela unidade de nefrologia pediátrica do HC UFMG** » e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto. O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dr. Dirceu Bartolomeu Greco
Presidente do COEP/UFMG

8.2 Ata de defesa

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR	
---	--	---

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA
PAULA CRISTINA DE BARROS PEREIRA - 2009701253

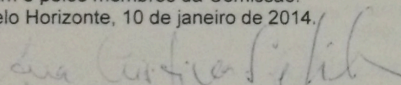
Realizou-se, no dia 10 de janeiro de 2014, às 10:00 horas, Faculdade de Medicina, 5º andar, sala 526, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE DUAS FAMÍLIAS COM CASOS DE ACIDOSE TUBULAR RENAL DISTAL POR MEIO DE WHOLE-EXOME*, apresentada por PAULA CRISTINA DE BARROS PEREIRA, número de registro 2009701253, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Ana Cristina Simões e Silva - Orientador (UFMG), Prof(a). Debora Marques de Miranda (UFMG), Prof(a). Luiz Armando Cunha de Marco (UFMG), Prof(a). Sérgio Veloso Brant Pinheiro (UFMG), Prof(a). Elvis Cueva Matteo (UFMG), Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues (Universidade Federal de Juiz de Fora).

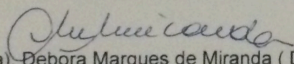
A Comissão considerou a tese:

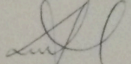
Aprovada

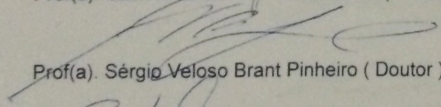
Reprovada

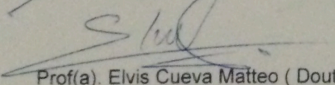
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
 Belo Horizonte, 10 de janeiro de 2014.

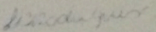

 Prof(a). Ana Cristina Simões e Silva (Doutor)


 Prof(a). Debora Marques de Miranda (Doutor)


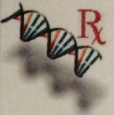

 Prof(a). Luiz Armando Cunha de Marco (Doutor)


 Prof(a). Sérgio Veloso Brant Pinheiro (Doutor)


 Prof(a). Elvis Cueva Matteo (Doutor)


 Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues (Doutora)

8.3 Declaração de aprovação

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR</p>	
---	---	---

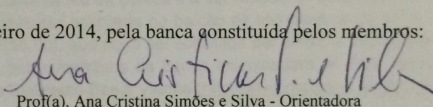
FOLHA DE APROVAÇÃO

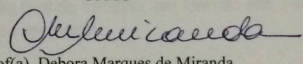
DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE DUAS FAMÍLIAS COM CASOS DE ACIDOSE TUBULAR RENAL DISTAL POR MEIO DE WHOLE-EXOME

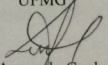
PAULA CRISTINA DE BARROS PEREIRA

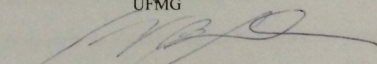
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

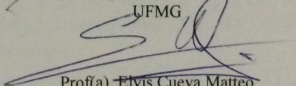
Aprovada em 10 de janeiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:

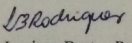

Prof(a). Ana Cristina Simões e Silva - Orientadora
UFMG


Prof(a). Debora Marques de Miranda
UFMG


Prof(a). Luiz Armando Cunha de Marco
UFMG


Prof(a). Sérgio Veloso Brant Pinheiro
UFMG


Prof(a). Elvis Cueva Matteo
UFMG


Prof(a). Luciana Bastos Rodrigues
Universidade Federal de Juiz de Fora

Belo Horizonte, 10 de janeiro de 2014.

8.4 Artigo Original



ARTIGO ORIGINAL

Whole-exome sequencing as a diagnostic tool for distal renal tubular acidosis[☆]



Paula Cristina Barros Pereira^a, Flávia Medeiros Melo^a,
Luiz Armando Cunha De Marco^{a,b}, Eduardo Araújo Oliveira^{a,c},
Débora Marques Miranda^{a,c} e Ana Cristina Simões e Silva^{a,c,*}

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

^b Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

^c 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.jped.2015.02.002>

[☆] 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 (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⁺ 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/CO₂ no sangue.¹ 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.² 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.³

A ATR distal pode ser transmitida como uma característica autossômica dominante ou recessiva.⁴ O fenótipo autossômico dominante normalmente aparece moderadamente na adolescência ou na vida adulta;⁴ 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.^{2,5,6} 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.² A ATRd autossômica recessiva está associada a mutações em quaisquer dos seguintes genes: *SLC4A1*,⁷ *ATP6V0A4* e *ATP6V1B1*.^{2,8} 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.³ De fato, existem pacientes com ATRd com surdez sem mutações no gene *ATP6V1B1* e outros com audição normal que não apresentam mutações no gene *ATP6V0A4*.³ 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.⁸⁻¹⁰ 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.^{11,12} 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.^{11,12} 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°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 (SeqCap 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.¹³ 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 poliacrilamida. 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 neurosensorial; 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.

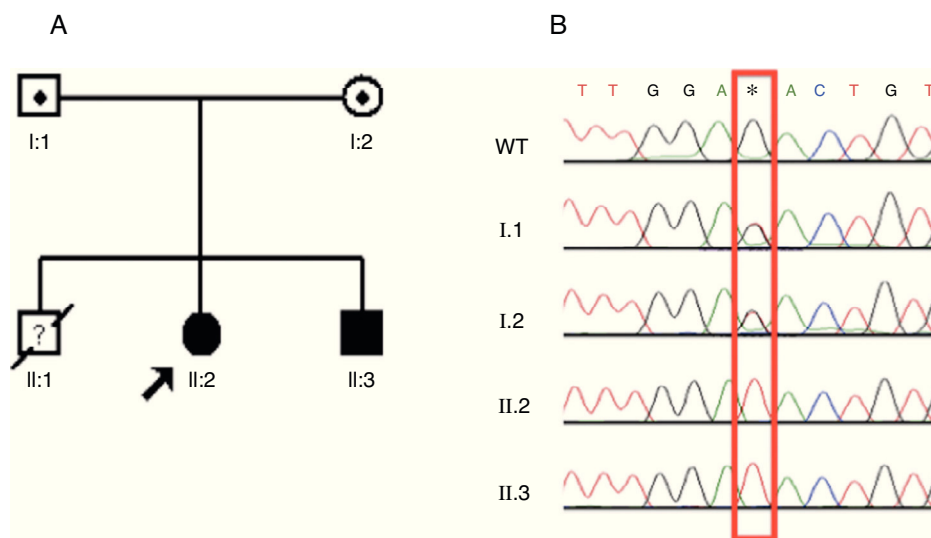


Figura 1 Identificação, linhagem da família um e resultados de sequenciamento para mutação c.1232G > T. A) A linhagem mostra os estados afetados, identificadores individuais e genótipos no códon 411. A seta indica o probando. B) Cromatogramas do sequenciamento do DNA em que os dois irmãos afetados têm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

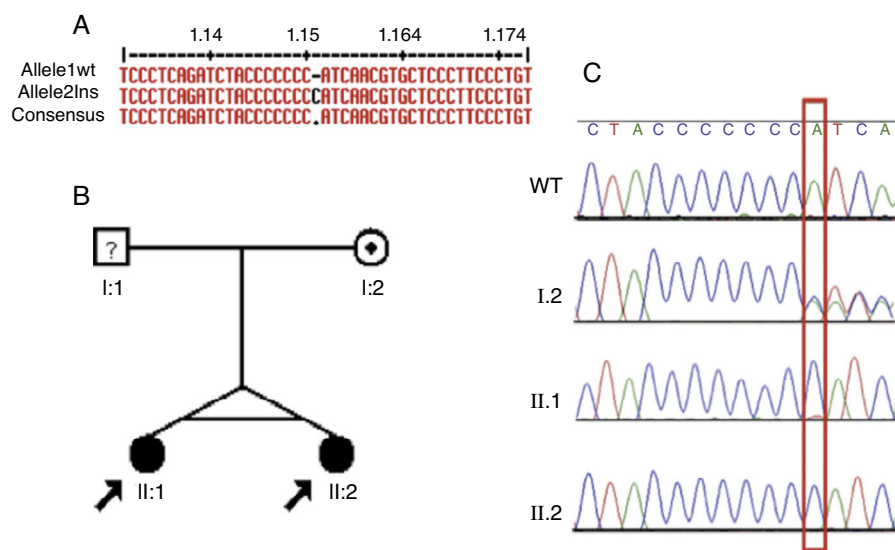


Figura 2 Identificação, linhagem da família dois e resultados de sequenciamento para mutação c.1149_1155insC. A) Identificação da mutação c.1149_1155insC com o *software* MultAlin. B) A linhagem mostra os estados afetados, identificadores individuais e genótipos em c.1149-1155insC. A seta indica os probandos 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 homozigótica de um C e a mãe tem um traço heterozigótico, conforme marcado pela caixa vermelha. WT, alelo selvagem.

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

Discussão

Vários erros de DNA estão localizados em éxons e levam a alterações estruturais nas proteínas e alterações funcionais.³ 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.^{14,15} 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.^{11,12} 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.¹⁶ 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.⁴ 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,⁴ conforme observado em nossos casos. A ATRd autossômica recessiva tem sido relacionada a mutações nos genes *ATP6V1B1* e *ATP6VOA4*, que codificam as subunidades α 4 e B1 da ATPase de próton do tipo vacuolar (V- ou H+-ATPase), respectivamente.¹⁷⁻²² Além disso, mutações no gene *SLC4A1*, responsável pela expressão de proteínas AE1, também foram detectadas em casos de ATRd autossômica recessiva sem surdez.²³⁻²⁸

De fato, mutações em diferentes subunidades da bomba de próton expressas em tecidos renais e de ouvidos podem causar defeitos tubulares relacionados à surdez.¹⁷ 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 (α -e e A-H, respectivamente), responsáveis pela hidrólise do ATP e transporte de prótons, respectivamente.⁴ O gene *ATP6V1B1* codifica a subunidade B1, ao mesmo tempo em que o gene *ATP6VOA4* codifica a subunidade α 4. O próton ATPase vacuolar é expresso apicalmente em células renais α 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*.¹⁸⁻²⁰ 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.²²⁻²⁸ 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 anteriores¹⁰ 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 Provean 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,⁹ 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,²⁹ 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

- 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⁺ 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 gly-cophorin 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⁺-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/HCO₃-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⁺-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.