

Aplicação da biologia molecular na abordagem da síndrome de Bartter: relato de caso

Application of molecular biology at the approach of Bartter's syndrome: case report

Autores

Geisilaine Soares dos Reis¹
 Débora Marques de Miranda¹
 Paula Cristina de Barros Pereira¹
 Helena Cunha Sarubi¹
 Luciana Bastos Rodrigues¹
 Luiz Armando Cunha de Marco¹
 Ana Cristina Simões e Silva¹

¹Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Data de submissão: 16/08/2011
 Data de aprovação: 27/09/2011

Correspondência para:

Ana Cristina Simões e Silva
 Avenida Alfredo Balena,
 110, 2º andar, sala 267 –
 Santa Efigênia
 Belo Horizonte – MG – Brasil
 CEP 30130-100
 E-mail: ana@medicina.ufmg.br

Suporte financeiro:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMG, processo CBB-APQ-00075-09, e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) processo 573646/2008-2.

O referente estudo foi realizado no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular – INCT-MM.

Os autores informam a inexistência de conflitos de interesse.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo mostrar a utilidade da biologia molecular para o diagnóstico da síndrome de Bartter (SB) por meio do relato de caso de duas irmãs e propor um algoritmo para abordagem molecular dessa síndrome. Os dois casos relatados apresentaram prematuridade, gestação complicada com poli-hidrânio e baixo peso ao nascer. Durante o primeiro ano de vida, as crianças apresentaram poliúria, polidipsia e atraso no crescimento, o que levou à investigação de doenças tubulares renais e erros inatos do metabolismo. Os exames laboratoriais sugeriram SB, mas a confirmação diagnóstica só foi obtida pela detecção de mutação em homozigose no exon 5 do gene *KCNJ1*, resultando em substituição do aminoácido alanina por valina no códon 214 (A214V) nas duas fitas de DNA nas duas irmãs e de mutação em heterozigose em seus pais. O diagnóstico de certeza da SB muitas vezes é difícil de ser obtido. Dessa forma, por meio dos casos relatados, mostrou-se a utilidade de métodos moleculares para o diagnóstico de certeza da SB, e foi proposto um algoritmo para a utilização racional dessas técnicas.

Palavras-chave: Biologia Molecular. Erros Inatos do Transporte Tubular Renal. Síndrome de Bartter.

INTRODUÇÃO

A síndrome de Bartter (SB) consiste em um grupo heterogêneo de tubulopatias, de herança autossômica recessiva e dominante, decorrente do comprometimento da reabsorção de sódio e de cloro na porção espessa ascendente da alça de Henle.¹⁻³ Os

ABSTRACT

This paper aims to show the utility of molecular biology for diagnose Bartter syndrome (BS) by the case report of two sisters and to propose a diagram for the molecular approach of this syndrome. The two reported cases presented prematurity, pregnancy complicated with polyhydramnio and low birth weight. During the first year of life, children exhibited polyuria, polydipsia and failure to thrive, leading to the investigation of renal tubular diseases and innate errors of metabolism. The laboratorial exams suggested BS, but the definitive diagnostic was only obtained by the detection of homozygous mutation on the exon 5 of the gene *KCNJ1*, resulting in a substitution of the aminoacid alanin for valin on codon 214 (A214V) in both DNA stripes in the two sisters and a heterozygous mutation in their parents. The definitive diagnostic of BS is frequently very difficult to be obtained. Consequently, considering the reported cases, we showed the utility of molecular techniques for the definitive diagnostic of BS and we proposed a diagram for the rational use of these techniques.

Keywords: Molecular Biology. Renal Tubular Transport, Inborn Errors. Bartter Syndrome.

estudos moleculares permitiram a identificação de pelo menos cinco diferentes subtipos da síndrome.¹⁻⁶ (Tabela 1)

A SB tipo I pode cursar com hipercalciúria, nefrocalcinose, alcalose metabólica e hipocalemia, decorrente de mutações em *SLC12A1*, que codifica o cotransportador bumetanida-sensível, *NKCC2*.^{3,6} A SB tipo

Tabela 1 TIPOS DE SÍNDROME DE BARTTER CONFORME SUA NOMENCLATURA USUAL, GENES AFETADOS E DENOMINAÇÃO CLÍNICA

Tipo de SB	Mutação genética	Localização	Denominação clínica
SB tipo I	SLC12A1	12q15-21	Neonatal, pré-natal
SB tipo II	KCNJ1	11q24	Neonatal
SB tipo III	CLCNKB	1p36	Clássica
SB tipo IV	BSND	1p32.1	Neonatal com surdez
SB tipo V	CASR	3q13	Neonatal com surdez

SB: síndrome de Bartter.

II caracteriza-se por poli-hidrânio durante a gestação, prematuridade, poliúria intensa e aumento de prostaglandinas E. É causada por mutações em *Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1* (KCNJ1), que codifica o canal de potássio *renal outer medullary K* (ROMK).^{2,7} Alterações no gene *chloride channel Kb* (CLCNKB), que codifica CLC-Kb, reduzem a atividade do canal, produzindo a SB tipo III, associada à perda significativa de sal e hipocalemia.^{8,9} A SB tipo IV é uma forma pré-natal associada à surdez neurossensorial e insuficiência renal precoce.¹⁰ É, principalmente, causada por mutações em *Bartter syndrome, infantile, with sensorineural deafness* (BSND), que codifica a proteína bartina, a qual modula a estabilidade, a localização superficial celular e a função dos canais CIC-Ka e CIC-Kb.¹⁰ A SB tipo V consiste em mutação de ganho de função no gene CASR do receptor sensível ao íon cálcio (CaR).^{2,3} Mutações em *Calcium Sensing Receptor* (CaSR) podem causar formas autossômicas dominantes da SB.²⁻⁵

Portadores de SB enfrentam diversas dificuldades para o tratamento, já que o diagnóstico é frequentemente tardio, o que implica em condução inadequada por longos períodos, evoluindo com nefrocalcinose e, até mesmo, doença renal crônica (DRC) terminal.⁹ O objetivo deste relato de caso foi mostrar a apresentação clínica de duas irmãs com SB e a importância da caracterização genética para o diagnóstico definitivo. Pretendeu-se também propor um fluxograma para a utilização racional de técnicas de biologia molecular para o diagnóstico da SB.

RELATO DE CASO

CASO 1

O caso índice é uma menina, de um ano de idade, que nasceu com 34 semanas, com poli-hidrânio e baixo peso ao nascimento (1.940 g). Durante o primeiro ano de vida, a criança apresentou episódios de febre recorrente, vômito, poliúria, polidipsia e déficit de crescimento. Foi submetida à ampla investigação e diversos tipos de tratamento,

sem sucesso. Os pais da criança são primos de primeiro grau. O diagnóstico de SB foi inicialmente estabelecido em bases clínico-laboratoriais por meio da detecção de perda urinária de sal (fração excretada de Na⁺ = 3,5 %) associada à hipocalemia intermitente (K⁺ = 3,2 a 3,7 mEq/L), hipocloremia importante (Cl⁻ = 93 mmol/L), alcalose metabólica (HCO₃⁻ = 30), hiperfiltração (220 mL/min/1,73 m²), hipercaliúria (Ca⁺² urinário = 6,5 mg/kg/dia) e aumento das concentrações de aldosterona (65 pg/mL) e da atividade de renina plasmática (4,3 ngAngI/mL/h). O ultrassom renal mostrou leve nefrocalcinose medular.

CASO 2

A partir do caso índice e da consanguinidade dos pais, foi aventada possibilidade de SB em sua única irmã mais velha. Essa criança também apresentou poli-hidrânio, prematuridade (34 semanas) e baixo peso ao nascimento (2.235 g). Durante os primeiros anos de vida, a menina foi assintomática. Aos três anos de idade, exibiu moderada poliúria e polidipsia associadas a discreto atraso do crescimento. Os exames laboratoriais revelaram hipocloremia (Cl⁻ = 96 mmol/L), alcalose metabólica (HCO₃⁻ = 28 mEq/L) com níveis séricos de potássio nos limites inferiores da normalidade, perda urinária de sal (fração de excreção de Na⁺ = 2 %), hiperfiltração (150 mL/min/1,73 m²) e níveis urinários de cálcio no limite superior (3,8 mg/Kg/dia). O ultrassom renal também revelou discreta nefrocalcinose medular, assim como a atividade da renina plasmática (2,2 ngAng I/mL/h) e as concentrações plasmáticas de aldosterona (47 pg/mL) encontravam-se elevadas.

DNA foi extraído de sangue total das pacientes e dos pais, de acordo com protocolo padrão. Detalhes da reação da PCR e os oligonucleotídeos utilizados estão disponíveis mediante solicitação. O sequenciamento automático (ABI 3130, Applied Biosystems, Foster City, CA) identificou mutação em homozigose no exon 5 do gene KCNJ1, resultando em substituição do aminoácido

alanina por valina no códon 214 (A214V) nas duas fitas das crianças e em heterozigose nos pais (Figura 1).

O tratamento inicial de ambas consistiu basicamente em suplementação de cloreto de sódio, indometacina, hidroclorotiazida para controle da hipercalcúria e suplementação oral de potássio. Essa abordagem determinou melhora clínica e laboratorial de ambas, caracterizada pela normalização das alterações metabólicas e retomada do crescimento. A nefrocalcinose regrediu e a função renal se mantém preservada.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da SB em centros de referência normalmente é possível por meio da experiência da equipe.¹¹ Alguns achados podem direcionar o diagnóstico como a presença de nefrocalcinose, frequente em pacientes com mutações nos genes *KCNJ1* e *SLC12A1*. No entanto, outros sinais e sintomas são comuns aos diversos tipos de SB, tais como: baixo peso ao nascimento, poli-hidrânio e prematuridade. O relato de consanguinidade dos pais e/ou história de casos semelhantes na família também pode aumentar a suspeita clínica. Nos casos relatados, a consanguinidade foi um dos aspectos que motivou a pesquisa de SB na irmã mais velha, apesar da ausência de sintomas significativos. Mesmo o diagnóstico de SB sendo possível em bases clínico-laboratoriais, somente a pesquisa de mutações genéticas permite o diagnóstico definitivo e possibilita o aconselhamento genético para as famílias.

No início dos anos 1990, era difícil distinguir alguns tipos de SB de outras tubulopatias, como a síndrome de Gitelman. Dessa forma, embora pouco disponível em nosso meio, o uso de ferramentas moleculares para o diagnóstico da SB tem-se tornado cada vez mais importante.^{2,5,6,9} O uso racional da biologia molecular certamente permitirá maior compreensão da genética da SB, tornando mais individualizada a abordagem dos pacientes.

Existem poucos estudos sobre o diagnóstico genético da SB.^{2,5,6,9,12} Merece menção o estudo recente de Brochard *et al.*,² que avaliou mutações em 42 crianças com SB. A maior parte delas apresentou mutações no gene *KCNJ1* em heterozigose (45%). A hipercalcemia neonatal transitória, que, frequentemente, é pouco diagnosticada, foi detectada em 63% das crianças com mutação no gene *KCNJ1* e não foi observada em crianças com mutações em outros genes.² Nozu *et al.*¹² mostraram que a análise do material genético em células encontradas na urina de pacientes pode evitar a necessidade de procedimentos mais invasivos, tais como: coletas de sangue e biópsia renal. A

metodologia proposta por esses autores permitiu analisar mutações no gene *SLC12A1* da SB tipo I.¹²

Em nosso país, as principais dificuldades relacionadas ao diagnóstico da SB, mesmo em Centros de Referência, são a identificação precisa de qual mutação está envolvida. Nesse sentido, a inclusão de técnicas moleculares na abordagem da SB pode evitar atraso no diagnóstico e no tratamento, além de proporcionar aconselhamento genético para a família. Dessa forma, propôs-se a utilização de um fluxograma para racionalizar o diagnóstico molecular da SB em serviços de referência (Figura 2). Conforme mostrado na Figura 2, a apresentação clínica e laboratorial da doença deve direcionar a avaliação molecular inicial do paciente. Ressalta-se que foram descritos casos de mutações combinadas dos canais de cloro, cujo quadro clínico se assemelha ao de mutações da “Bartina”.¹³ Esses casos raros podem dificultar o diagnóstico, mas, ainda assim, permitem o uso do fluxograma proposto.

Este artigo apresenta o relato de dois casos de SB nos quais a pesquisa de mutações permitiu o diagnóstico de certeza, e propõe um fluxograma para abordagem molecular racional desses casos. Estudos moleculares com maior número de pacientes são necessários para a compreensão da expressão genética da doença em nosso país.

Figura 1. Resultado do sequenciamento realizado nas pacientes (C-Paciente 2 e D-Paciente 1) e nos pais (A-Pai e B-Mãe) evidenciando a alteração homocigótica recessiva nas pacientes e sua ausência nos pais.

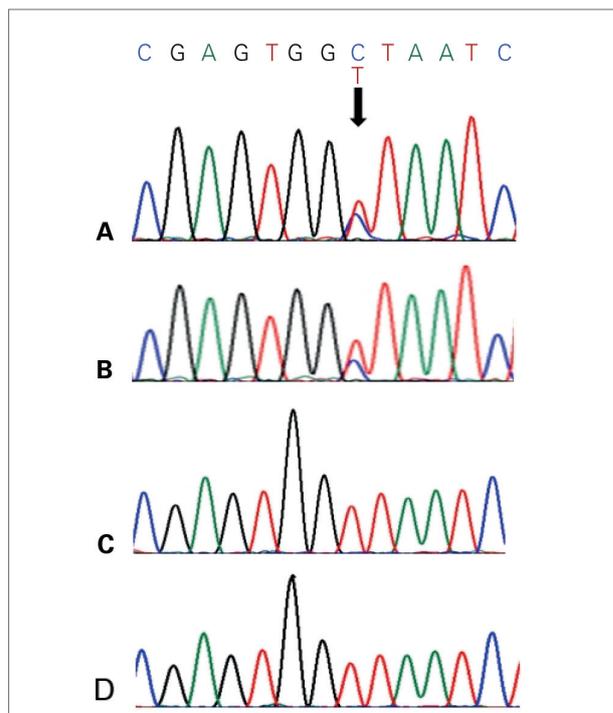
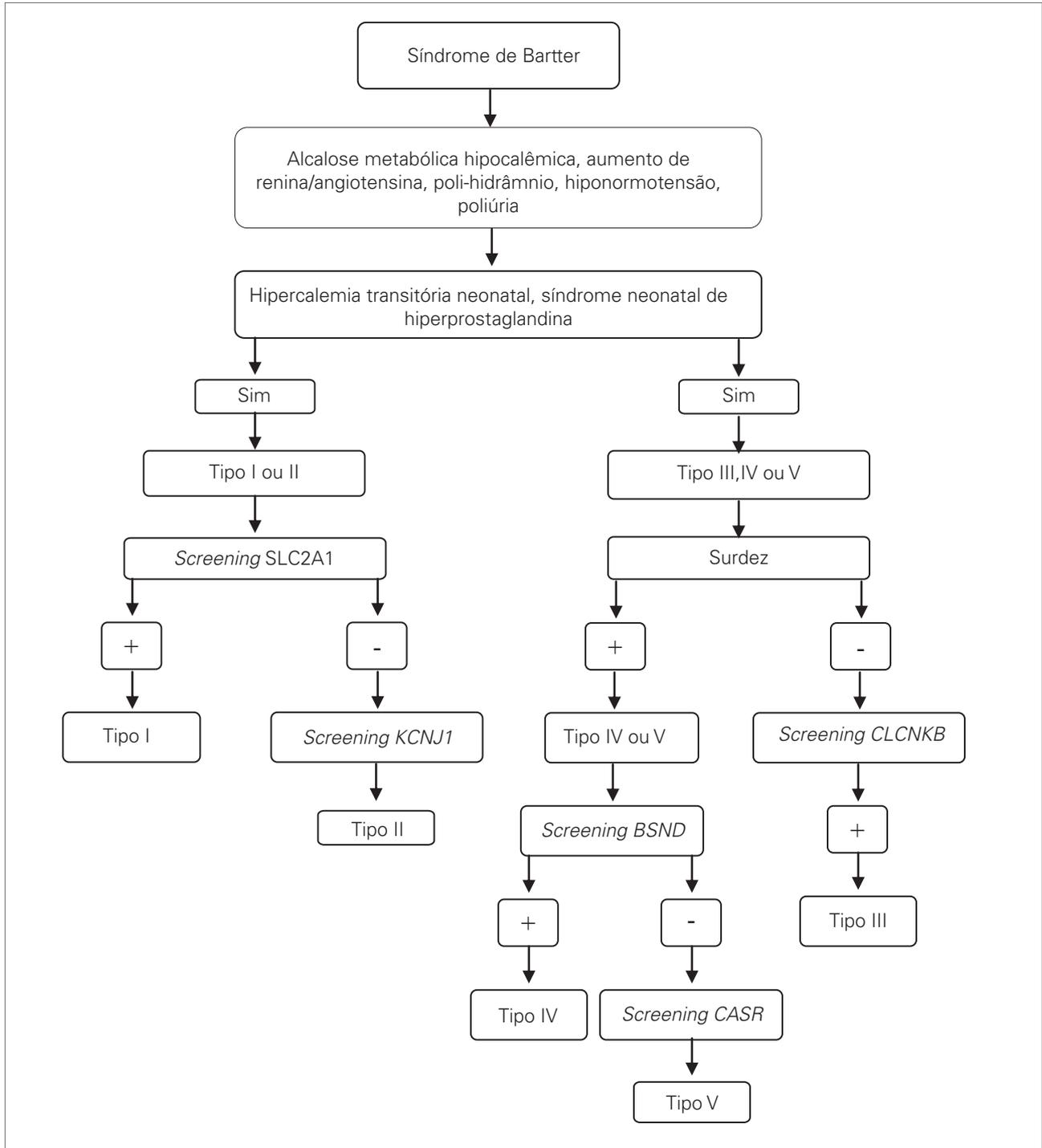


Figura disponível em cores no site: www.jbn.org.br/

Figura 2. Fluxograma de investigação diagnóstica para síndrome de Bartter com inclusão de análises genéticas.



REFERÊNCIAS

1. Seyberth HW. An improved terminology and classification of Bartter-like syndromes. *Nat Clin Practice* 2008;4:560-7.
2. Brochard K, Boyer O, Blanchard A, *et al.* Phenotype-genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1455-64.
3. Gamba G, Friedman PA. Thick ascending limb: the Na(+):K(+):2Cl(-) co-transporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR. *Pflügers Arch* 2009;458:61-76.
4. Kleta R, Bockenhauer D. Bartter syndromes and other salt-losing tubulopathies. *Nephron Physiol* 2006;104:73-80.
5. Finer G, Shalev H, Landau D. Genetic kidney diseases in the pediatric population of southern Israel. *Pediatr Nephrol* 2006;21:910-6.

6. Adachi M, Asakura Y, Sato Y, *et al.* Novel SLC12A1 (NKCC2) Mutations in two families with Bartter syndrome type 1. *Endocrine J* 2007;54:1003-7.
7. Welling PA, Ho K. A comprehensive guide to the ROMK potassium channel: form and function in health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297:F849-F863.
8. Watanabe T, Tajima T. Renal cysts and nephrocalcinosis in a patient with Bartter syndrome type III. *Pediatr Nephrol* 2005;20:676-8.
9. Rodriguez-Soriano J, Vallo A, Nanclares G.P, Bilbao J.R, Castano L. A founder mutation in the CLCNKB gene causes Bartter syndrome type III in Spain. *Pediatr Nephrol* 2005;20:891-6.
10. Jansen AGH, Scholl U, Domeyer C, Nothmann D, Leinenweber A, Fahlke C. Disease-causing dysfunctions of bartin in Bartter syndrome type IV. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:145-53.
11. Ayres Lima CJC, Simões e Silva AC. Síndrome de Bartter: cinco casos com diferentes apresentações clínicas. *J Pediatr (RJ)* 2003;79:471-2.
12. Nozu K, Ijima K, Kawai K, *et al.* *In vivo* and *in vitro* splicing assay of SLC12A1 in a antenatal salt-losing tubulopathy patient. *Hum Genet* 2009;126:533-8.
13. Schlingmann KP, Konrad M, Jeck N, *et al.* Salt wasting and deafness resulting from mutations in two chloride channels. *N Engl J Med* 2004;350:1314-9.