

INVESTIGAÇÃO DOS GENES KYNU E HAAO EM TRIOS FAMILIARES COM DIAGNÓSTICO DE VACTERL

AUTORES: Felipe Marques; Elda Noronha; Lucas Feitosa; e Daniel Cohn.

NOME DAS INSTITUIÇÕES: Universidade CEUMA e Universidade da Califórnia – Los Angeles (UCLA).

INTRODUÇÃO

Incidência estimada das doenças genéticas do esqueleto: 1:4.500–5.000 nascimentos
Formas letais: aproximadamente 1:10.000 nascimentos
Até 1997: classificação baseada em dados clínicos e de imagem
Após o Projeto Genoma Humano: introdução do diagnóstico molecular na classificação das doenças esqueléticas

ASSOCIAÇÃO VACTERL

Associação VACTERL: múltiplas malformações congênitas (vertebrais, anorretais, cardíacas, renais, membros, fístula traqueoesofágica).
Etiologia pouco compreendida, mas genes da via da quinurenina (KYNU, HAAO) envolvidos.
Deficiência de NAD pode afetar a embriogênese → possível fator causal.

Gene *KYNU*

Genômica: localizado no cromossomo 2q22.2, contém 15 éxons. Codifica a quinureninase, enzima da via da quinurenina, essencial para a biossíntese de NAD.
Proteína: atua na degradação de L-quinurenina em ácido antranílico. A perda de função compromete a síntese de NAD, impactando o metabolismo energético e a embriogênese.

Gene *HAAO*

Genômica: localizado no cromossomo 2q33.3, possui 6 éxons. Codifica a 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenase (HAAO).
Proteína: catalisa a oxidação de 3-hidroxiantranilato em ácido quinolínico, precursor direto do NAD. Alterações podem reduzir a disponibilidade de NAD e prejudicar processos de desenvolvimento.

OBJETIVO

Investigar variantes nos genes KYNU e HAAO, ambos envolvidos na biossíntese de NAD, em três trios familiares compostos por pai, mãe e filho com diagnóstico clínico da associação VACTERL.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado em colaboração entre a Universidade CEUMA e a UCLA, sob aprovação ética (protocolo 14-000177). Três trios familiares foram incluídos. Foram desenhados primers específicos para todos os éxons dos genes KYNU (15 pares) e HAAO (6 pares). A amplificação foi feita por PCR convencional, com visualização em gel de agarose a 1,5%. Os produtos amplificados foram sequenciados por Sanger e analisados no software CLC Main Workbench.



Tabela 1: Primers específicos flanqueadores dos éxons do gene *HAAO*.

Primer	Sequencia	Tamanho (pb)
HAAO EX1F	CTCGTGAGCTTGGGATTCTG	261
HAAO EX1R	ACTCGGAGCTGGAAGGTGAG	
HAAO EX2F	GACCCGTGCTCTCTTCACTC	248
HAAO EX2R	CTCTCCAGTCCATCATCTCTGG	
HAAO EX3-4F	GAAAGTTTCTCAGGTTTCCCG	753
HAAO EX3-4R	TTCTTGAGTCTATCTAGGATCCCTTC	
HAAO EX5-6F	GACTTCTACAAGCAGAGCCAGG	587
HAAO EX5-6R	CATCCTATTTTGGAGGGGAG	
HAAO EX7F	AGCCTGTTCTGGCAATTGAG	327
HAAO EX7R	CAGTGAGAGAGAGACTGGTTCCC	
HAAO EX8-10F	GCCAGGTTCAAGACCATCTC	663
HAAO EX8-10R	GCAGTACACAGAGAGGTAGTGGG	

(F) forward ou primer iniciador 5'; (R) reverse ou primer iniciador 3'; (SEQ.) sequência de nucleotídeos que formam os primers; (PROD. SIZE) quantidade de pares de bases.

Tabela 2: Lista de primers utilizados¶

PRIMER¶	SEQUENCIA¶	TAMANHO¶
KYNU-EX2F¶	TTTCTACAGGAAAATTATGGTGGC¶	368¶
KYNU-EX2R¶	CTTTTCAAACATAATTGCAACAGC¶	
KYNU-EX3F¶	TTTGTACTGGCTTAACAATACCATAC¶	285¶
KYNU-EX3R¶	CACATCTTTCCAAATATTAGACAAC¶	
KYNU-EX4F¶	TTTGAAATAATCACACACATGCAC¶	241¶
KYNU-EX4R¶	TTCAATAAGATTTTGACTTTATGAGC¶	
KYNU-EX5F¶	GACATTAAGAATGATTGAGTGAAGTC¶	244¶
KYNU-EX5R¶	CCCAGAAAGCTCATGAATTAAGATAG¶	
KYNU-EX6F¶	CATGGCTAATTGAAAAGGTAGTCC¶	296¶
KYNU-EX6R¶	AGGCAAATGATACACTGCTCTAGG¶	
KYNU-EX7F¶	TTGTTTAGGTGTTTTAACCTTCACC¶	346¶
KYNU-EX7R¶	AACAGAAGTATAGGTCCTTCATGC¶	
KYNU-EX8F¶	ATTTTATAATGCAAAAGGGCTCAC¶	342¶
KYNU-EX8R¶	AAGCTAAAGTACTTCACAAGTCATGC¶	
KYNU-EX9F¶	GGTACAGAAGTTTGTCAAATGTTTTC¶	293¶
KYNU-EX9R¶	AACTCAAATCTTTAAAATTGGCCC¶	
KYNU-EX10F¶	GAAGTATCAAATGTTGTGGTTTC¶	283¶
KYNU-EX10R¶	TCCTATTGGATAGCATCTTAAGGAAC¶	
KYNU-EX11F¶	AGCAGAGCAAGACTCCATCC¶	210¶
KYNU-EX11R¶	CCCTGGGGCATATACATTACAC¶	
KYNU-EX12F¶	AAGCTTGCTCTTTTACTCTCCAG¶	281¶
KYNU-EX12R¶	ATGTATCATCTTGCTGTGTAGCAG¶	
KYNU-EX13F¶	AAGATCAAATATGGGCATTTCC¶	401¶
KYNU-EX13R¶	GTCCAAATTTTATCCCTAACATGC¶	
KYNU-EX14F¶	TCTGGAATGTAGATTTTCAACGTG¶	252¶
KYNU-EX14R¶	ACTGAAATAACCCACAGCAGCTTTC¶	
KYNU-EX11F-¶	TCTAGCCTTGGCTCTCTATTCTGT¶	240¶
KYNU-EX11R-¶	ACAGGTGGTATTTGATTTTCAGGT¶	
KYNU-EX5F-ALT¶	TAATTTTCATGGTACCCTTTTGTGG¶	248¶
KYNU-EX5R-ALT¶	TCTTCCTCTCTCAAGGTTTCAGTT¶	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Lista de variantes identificadas nos genes HAAO e KYNU

Id	Familia	Gene	Exon	Cromossomo	cDNA	Proteína	Ref	Filho	Mãe	Pai	ExAc	Polyphen	SIFT	Conclusão
1	R09-321	HAAO	2	2	c.80-10C>T	N/A	C	T/T	T/T	C/T	0,7988	N/A	N/A	Benigno
2	R09-321	HAAO	2	2	c.109A>G	p.Ile37Val	A	G/G	G/G	A/G	0,8014	N/A	N/A	Benigno
3	R09-321	HAAO	2	2	c.124A>T	p.Thr42Ser	A	A/T	A/T	A/A	0,2858	benigno	tolerado	Benigno
4	R99-481	HAAO	2	2	c.80-10C>T	N/A	C	C/T	T/T	C/T	0,7988	N/A	N/A	Benigno
5	R99-481	HAAO	2	2	c.109A>G	N/A	A	A/G	A/G	A/G	0,8014	N/A	N/A	Benigno
6	R83-004	HAAO	2	2	c.109A>G	N/A	A	A/A	G/G	G/G	0,8014	N/A	N/A	Benigno
7	R83-004	KYNU	11-ALT	2	N/A	N/A	C	C/C	C/G	C/C	0,2664	N/A	N/A	Benigno
8	R83-004	KYNU	13	2	c.1211C>T	p.Thr404Ile	C	C/T	C/T	C/C	2E-05	probably damaging	deleterious	Patológico
9	R99-481	KYNU	11-ALT	2	N/A	N/A	C	C/G	C/C	C/G	0,2664	benigno	tolerado	Benigno
10	R83-004	KYNU	3	2	c.256dupT	p.Y89LfsX3	T	T/T/T	T/T	T/T/T	0	N/A	N/A	Patológico
11	R09-321	HAAO	3-4	2	N/A	N/A	G	G/A	G/A	G/A	0,3296	benigno	tolerado	Benigno

Principais achados das análises genéticas dos genes HAAO e KYNU

identificação de variantes: Foram encontrados 11 possíveis genes candidatos: 7 variantes no gene HAAO e 4 variantes no gene KYNU.

Padrão de herança: Esperava-se que as variantes seguissem um padrão de herança autossômico recessivo, com pais portando mutações em heterozigose e o filho afetado em homozigose (ou heterozigose composta).

Diagnóstico da família R83-004: O diagnóstico foi fechado para uma das três famílias analisadas (R83-004). O filho afetado herdou duas variantes patológicas em homozigose no gene KYNU, uma de cada genitor, que possuíam as mutações em heterozigose.

Gene HAAO: Nenhuma variante significativa que pudesse explicar a doença foi encontrada no gene HAAO.

CONCLUSÃO

Com as variantes encontradas, conclui-se que estas mutações no gene KYNU leva à perda de função do mesmo, onde ocorre um déficit no metabolismo do NAD (Nicotinamida Dinucleotide e Adenina) que pode resultar em uma malformação congênita. Desta forma, este trabalho poderá ajudar em um tratamento mais adequado ao paciente, ou mesmo em um aconselhamento genético à família de pacientes diagnosticados com a doença e, ao entendimento acerca do funcionamento deste gene, que também será de grande importância no meio científico.

REFERÊNCIAS

CHEN, Y et al. The genetic landscape and clinical implications of vertebral anomalies in VACTERL association. J Med Genet. 53:431–437. 2016.
QUAN, L., & SMITH, D. W. (1973). The VATER association. Vertebral defects, Anal atresia, T-E fistula with esophageal atresia, Radial and Renal dysplasia: A spectrum of associated defects. The Journal of Pediatrics, 82(1), 104–107.
SHI, H., ENRIQUEZ, A., RAPADAS, M., MARTIN, EMMA, WANG, R., MOREAU, J., LIM, CK, SZOT, JO, IP, E., HUGHES, JN, SUGIMOTO, K., HUMPHREYS, DT E 21 OTHERS. NAD deficiency, congenital malformations and niacin supplementation. New Eng. J. Med. 377: 544-552, 2017.
SOLOMON BD. The etiology of VACTERL association: Current knowledge and hypotheses. Am J Med Genet Part C. 2018; 178C:440–446

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Maranhão, que através do edital de COOPERAÇÃO INTERNACIONAL PV3-03299/18 promoveu a internacionalização da pesquisa entre a Universidade CEUMA e a UCLA.