

## Espectro mutacional da cistinose em Portugal, 1998-2017

### Mutational spectrum of cystinosis in Portugal, 1998-2017

Filipa Ferreira<sup>1</sup>, Inês Leal<sup>2</sup>, David Sousa<sup>2</sup>, Teresa Costa<sup>3</sup>, Conceição Mota<sup>3</sup>, Ana Marta Gomes<sup>4</sup>, Daniela Lopes<sup>4</sup>, Maria do Carmo Macário<sup>5</sup>, Isabel Tavares<sup>6</sup>, Helena Pinto<sup>6</sup>, João Paulo Oliveira<sup>6-8</sup>, Rita Magriço<sup>9</sup>, Célia Carmona<sup>1</sup>, Sónia Ramos<sup>1</sup>, Raquel Neiva<sup>1</sup>, Ana Marcão<sup>1</sup>, Laura Vilarinho<sup>1,10</sup>

filipa.ferreira@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

(2) Centro Hospitalar Lisboa Norte, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal.

(3) Centro Hospitalar Universitário do Porto, Porto, Portugal.

(4) Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho, Portugal.

(5) Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal.

(6) Serviço de Genética Médica, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal.

(7) Unidade de Genética. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(8) Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(9) Serviço de Nefrologia, Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal.

(10) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal.

### Resumo

A cistinose é uma doença metabólica multisistémica, autossómica recessiva caracterizada por uma acumulação de cistina em diferentes órgãos e tecidos devido a uma deficiência no transporte de cistina para o exterior dos lisossomas. O gene responsável pela doença, *CTNS*, está localizado no cromossoma 17 e codifica para uma proteína de membrana lisossomal, a cistinossina. Neste trabalho foram estudados doentes não relacionados provenientes das consultas de adultos e pediatria de diferentes hospitais de Portugal continental e ilhas, que apresentavam proteinúria não-nefrótica, hipercalcúria, hipocalcemia, hiperaminoacidúria, glicosúria e hipofosfatemia, sugestivo de síndrome de Fanconi e queixas oculares. Bioquimicamente, a cistina intraleucocitária foi quantificada, tendo-se igualmente efetuado a caracterização molecular do gene *CTNS*, inicialmente apenas direcionado para a pesquisa da deleção de 57-kb, seguida da sequenciação de todos os exões codificantes do gene *CTNS*. Desde 1998 a 2017, 21 doentes cistinóticos foram bioquimicamente caracterizados. Entretanto, 4 destes doentes faleceram e dos restantes 17, apenas 11 foram estudados para o gene *CTNS*. Verificou-se que 5 destes 11 doentes foram homocigóticos para a deleção de 57-kb (10/22; 45,5%), e outros 5 foram compostos heterocigóticos para esta mutação (15/22; 68,2%). As outras mutações identificadas foram: p.Q128X (c.721 C>T; 2/22), p.S139F (c.755 C>T; 4/22) e c.18-21delGACT (p.T7FfsX7; 1/22). Todos estes 17 doentes cistinóticos estão em tratamento, sendo que 84% são adultos, 16% são crianças jovens e 54,5% são transplantados renais. Este estudo efetuado ao longo de vários anos, reflete a experiência no diagnóstico e monitorização dos doentes cistinóticos. Além disso, a caracterização das mutações encontradas no gene *CTNS*, ressalta a importância para um *screening* inicial da deleção de 57-kb e permite um futuro aconselhamento genético aos casais de risco.

### Abstract

Cystinosis is a multisystemic autosomal recessive deficiency of the lysosomal membrane transporter protein (cystinosin) caused by mutations in *CTNS* gene. This study summarizes the Portuguese experience in the di-

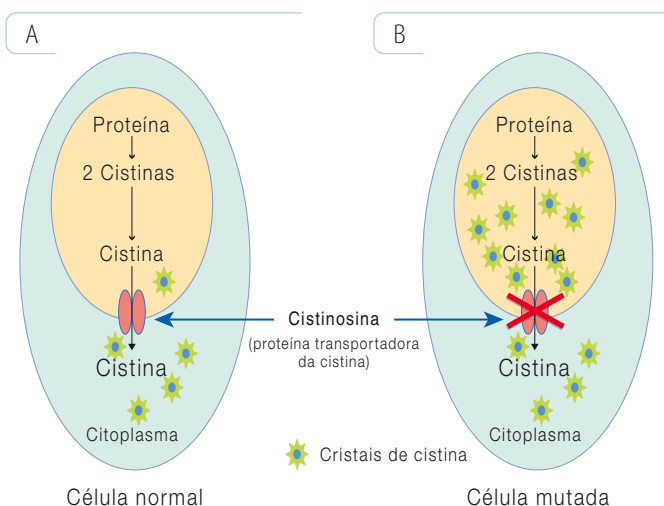
agnosis and management of patients with this rare disease over the past few years and reports recurrent mutations in the *CTNS* gene. Unrelated patients from different pediatric and adult hospitals all over Portugal with non-nephrotic proteinuria, hypercalciuria, hypokalemia impaired proximal reabsorption of amino acids, glycosuria and hypophosphatemia, suggestive of a Fanconi syndrome and ocular problems were studied. Intraleukocyte cystine levels were determined and molecular analysis performed, to determine the presence of the 57-kb deletion in *CTNS*, followed by direct sequencing of the coding exons of *CTNS*. From 1998 to 2017, 21 cystinotic patients were biochemically diagnosed. From the remaining 17 (4 deceased), 11 were studied for *CTNS* gene. Five out of 11 patients were homozygous for the 57-kb deletion (10/22; 45.5%), and other 5 were compound heterozygous for this variant (15/22; 68.2%). The other mutations found were p.Q128X (c.721 C>T; 2/22), p.S139F (c.755 C>T; 4/22) and c.18-21delGACT (p.T7FfsX7; 1/22). All of these 17 cystinotic patients are in treatment. Approximately 84% are adults, 16% are young children, and 54.5% are kidney transplant recipient. The authors would like to emphasize the importance of first screening for the 57-kb deletion since it is very common in our population. This genetic study is the first in Portugal and it could be the basis for future genetic counseling in cystinotic patients.

### Introdução

A cistinose (OMIM #606272) é uma doença metabólica rara autossómica recessiva, caracterizada por uma acumulação anormal de cistina em diferentes órgãos e tecidos devido a uma deficiência no transporte deste aminoácido para o exterior dos lisossomas, em resultado de mutações no gene *CTNS* (1). Este gene, está localizado no cromossoma 17p13, possui 12 exões, sendo que os primeiros dois exões são não-codificantes (2,3),

e os outros 10 exões codificam para uma proteína de membrana lisossomal, de 367 aminoácidos, denominada cistinosa (figura 1). A incidência desta doença estima-se ser de 1 para 100.000 – 200.000 nados-vivos, no entanto o número exato é difícil de estimar uma vez que esta doença é subestimada ou muitas vezes não diagnosticada. Um dos sinais clínicos de cistinose é a síndrome de Toni-Debré-Fanconi, o que deverá alertar o clínico para um possível diagnóstico desta doença (4). Apesar dos rins serem o primeiro órgão a ser afetado durante o primeiro ano de vida, na maioria dos casos, existe também o envolvimento de outros órgãos, nomeadamente os olhos, a tiroide, o pâncreas, as gónadas, os músculos e o sistema nervoso central (3,5). A gravidade do fenótipo clínico está correlacionada com o respetivo genótipo. A determinação da cistina intra-leucocitária é fundamental para o diagnóstico e monitorização da doença (6), sendo a concentração de cistina intra-leucocitária um marcador patognómico da cistinose.

Figura 1: Metabolismo da cistina intracelular num indivíduo normal (A) e num indivíduo doente com cistinose (B)



A deleção de 57 pares de bases (57-kb) no gene *CTNS* é a mutação mais comum na cistinose (7,8), estando representada em mais de 50% da população do norte da Europa e América do Norte (3,7-13) e igualmente correlacionada com elevadas concentrações de cistina nos leucócitos. Contudo, fora desta área geográfica, esta mutação deixa de ser prevalente, estando inclusivé em muitas regiões, ausente. Pre-

sentemente, mais de 200 mutações no gene *CTNS* têm sido identificadas (<http://www.hgmd.org/>) (13-17).

A cistinose tem três formas de apresentação clínica, que diferem na gravidade do fenótipo, idade de início dos sintomas e genótipo. A forma mais grave e também a mais frequente (em 95% dos casos) é a cistinose nefropática infantil, também denominada de cistinose nefropática clássica (MIM 219800); a forma juvenil nefropática (MIM 219900), menos severa e a forma ocular, não nefropática (MIM 219750) (18). A forma não nefropática ou também denominada cistinose ocular, apresenta-se regra geral, no adulto e manifesta-se exclusivamente pelo envolvimento ocular, através da deposição de cristais de cistina (18-20). Em alguns doentes, este envolvimento ocular precede as manifestações renais ao longo dos anos (21). Tem sido hipotetizado que as diferenças entre os diferentes fenótipos e a sua severidade se devem às diferentes mutações associadas com as três formas clínicas. Assim, parece que indivíduos com cistinose infantil apresentam mutações mais graves em ambos os alelos (ex.: perda da função da proteína), contrariamente às formas menos graves de cistinose que estão associadas a mutações menos patogénicas (7,22-24). O estudo molecular do gene *CTNS* é por isso também muito importante e ferramenta indispensável no diagnóstico pré-natal (25).

Existem presentemente, várias linhas de tratamento, que previnem ou adiam a deterioração da função renal e/ou da ocorrência de complicações extra-renais, como o hipotireoidismo, diabetes *mellitus*, retinopatia, encefalopatia e miopatia (26,27). A cistinose é um excelente exemplo de doença pediátrica cujo espectro atinge a idade adulta.

## \_Objetivo

Pretende-se com este trabalho divulgar a capacidade instalada de estudo desta doença rara bem como alertar para a importância do diagnóstico atempado da cistinose quer do ponto de vista bioquímico, através da quantificação da cistina intra-leucocitária, quer do ponto de vista do estudo molecular do gene *CTNS*.

## \_Material e métodos

### Doentes

Desde 1998 até 2017, vários doentes não relacionados provenientes das consultas de pediatria e de adultos de diversos hospitais de norte a sul de Portugal continental e ilhas, foram estudados com a hipótese de diagnóstico de cistinose. Em 32 doentes, foram referidos sintomas sugestivos de síndrome de Toni-Debré-Fanconi, nomeadamente: proteinúria não-nefrótica (<3,5g proteína/24h), hipercalcúria, hipocaliemia, hiperaminoacidúria, glicosúria e hiposfosfatemia. Destes doentes estudados, 21 revelaram valores elevados de cistina intra-leucocitária no sangue ( $\geq 0,5$  nmol/  $\frac{1}{2}$  cistina/mg proteína) (8 do sexo masculino e 13 do sexo feminino, com idades entre 1 e 40 anos), 4 faleceram, e em 2 perdeu-se o seguimento clínico (ex.: emigraram). Dos restantes 15, 11 foram geneticamente caracterizados.

De salientar que nestes 21 doentes confirmados com cistinose, apenas num deles o diagnóstico foi feito em idade adulta (com 40 anos), através da observação de cristais de cistina intraocular, no entanto este doente desde a idade pediátrica apresentava queixas nefropáticas (nomeadamente, proteinúria, calciúria, hipocalemia e hiperaminoacidúria).

### Caracterização bioquímica

A extração da cistina intra-leucocitária foi efetuada pelo método descrito por Shotelersuk *et al.* (1998) (28) e a quantificação deste aminoácido analisada por cromatografia líquida de troca iónica num BIOCHROM 30® (figura 3).

Os valores de referência utilizados foram os seguintes:

- Indivíduos saudáveis: <0,5 nmol  $\frac{1}{2}$  cistina/mg proteína.
- Indivíduos afetados sem tratamento:  $\geq 0,5$  nmol  $\frac{1}{2}$  cistina/mg proteína.
- Indivíduos afetados com boa adesão terapêutica:  $\leq 1,0$  nmol  $\frac{1}{2}$  cistina/mg proteína

## Caracterização molecular

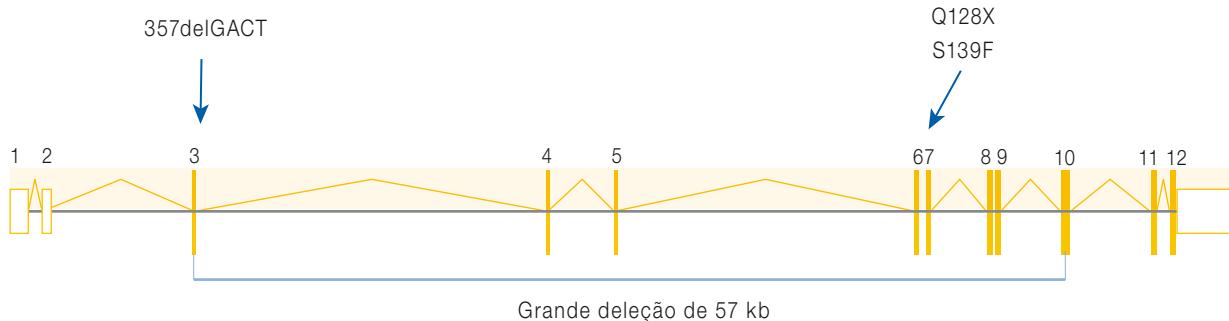
O DNA genómico foi extraído a partir de sangue total (EZ1, QIAGEN) e os 10 exões codificantes e as respetivas regiões flanqueadoras do gene *CTNS* (NM\_004937) amplificadas e sequenciadas através de métodos tradicionais. Em todos os doentes estudados, a deleção de 57-kb foi a primeira mutação a ser pesquisada. Como população controlo, foram estudados 100 indivíduos saudáveis (200 alelos), não consanguíneos e de origem portuguesa.

## \_Resultados e discussão

Durante 19 anos, 32 doentes com suspeita de cistinose foram estudados na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do INSA. Destes, 11 tinham uma cistina intra-leucocitária inferior a 0,5 nmol  $\frac{1}{2}$  cistina/mg proteína em 2 amostras consecutivas (4) e foram assim considerados negativos para cistinose. Dos restantes 21, a concentração da cistina intra-leucocitária variou entre 0,5 e 8,0 nmol  $\frac{1}{2}$  cistina/mg proteína, e em 11 destes doentes o estudo molecular do gene *CTNS* foi efetuado.

Todos os doentes estudados, acabaram por desenvolver queixas oculares que revelaram a presença de cristais de cistina intra-ocular. No gene *CTNS*, foram observadas quatro mutações patogénicas, sendo a deleção de 57-kb a mais frequente (68,2%; 15/22 alelos). Em 5 doentes, esta deleção encontrava-se em homozigotia (10/22; 45,5%) e em outros 5 doentes foram encontrados compostos heterozigóticos para a deleção de 57kb (45,5%) e para as mutações p.Q128X (c.721 C>T; 9,1%), p.S139F (c.755 C>T; 9,1%) e c.18-21delGACT (p.T7FfsX7; 4,5%) (tabela 1, figura 2). A mutação p.S139F foi observada pela primeira vez em homozigotia num doente. Neste estudo podemos concluir que doentes com mutações graves ou com mutações que originem proteínas truncadas, como a deleção de 57-kb e p.T7FfsX7 ou a mutação p.Q128X, apresentavam fenótipos severos associados com a forma infantil da doença, enquanto que a forma juvenil estava associado com fenótipos mais moderados. Os 17 doentes cistinóticos estão em tratamento, sendo que 84% são adultos, 16% são crianças e jovens e 54,4% já são transplantados renais.

Figura 2: Estrutura esquemática do gene *CTNS* (a amarelo).



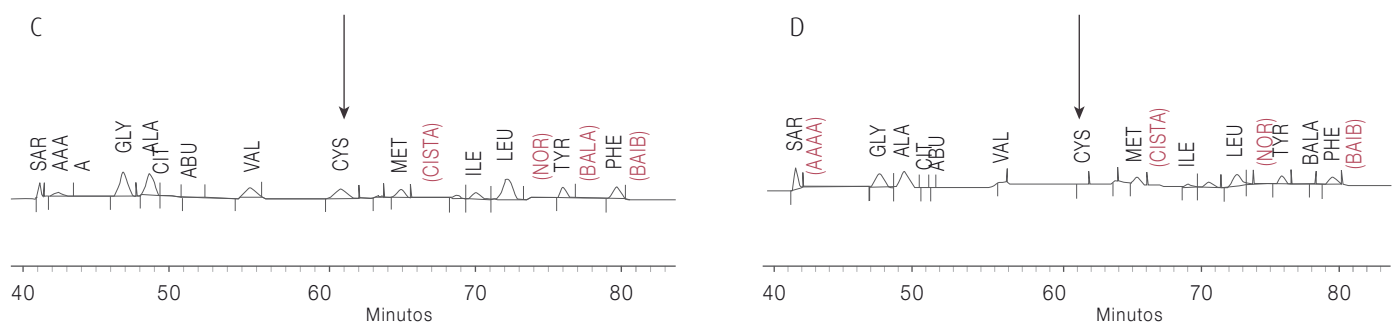
Os números indicam os exões e as setas azuis indicam as mutações encontradas nos 11 doentes cistinóticos caracterizados do ponto de vista molecular.

Também foi observado que os doentes com a deleção de 57-kb tinham valores de cistina intra-leucocitária mais elevados, o que também está de acordo com a literatura (figura 3, tabela 1), uma vez que esta mutação leva à ausência da proteína (4,8). De acordo com este estudo, em Portugal, a prevalência de cistinose está estimada em 1:92.000 recém-nascidos.

Analisando o espectro mutacional encontrado na população portuguesa com outras populações, verificamos que a deleção de 57-kb é na realidade a mutação mais prevalente, o que está de acordo com a literatura. De facto, esta mutação existe em praticamente 50% dos cromossomas de cistinose nas populações europeias (29,30). Está reportado na bibliografia que esta deleção teve um efeito fundador originado na Alemanha por volta do I milénio d.C (3,7,9). Provavelmente, através dos movimentos migratórios, esta mutação espalhou-se através da Europa e norte de África, havendo como que um gradiente

de norte para sul, à semelhança do que também aconteceu com a mutação F508del na fibrose quística. No entanto, se por um lado a deleção de 57-kb é a mais prevalente no norte da Europa e norte da América, nas populações de origem africana, no Mediterrâneo e Médio Oriente, o mesmo não acontece (14-16). Na realidade, fora desta área geográfica (Europa e norte da América), a deleção de 57-kb está praticamente ausente, havendo outras mutações prevalentes (31-34). Assim, a deleção de 57-kb deverá ser a primeira mutação a ser pesquisada, quer na população portuguesa bem como na população espanhola (4). Apesar das mutações: p.S139F e c.18-21delGACT (p.T7FfsX7), terem um efeito fundador espanhol (12), a deleção c.18-21delGACT (p.T7FfsX7) já foi encontrada em diferentes populações desde a população europeia até à população do Médio Oriente e associada a uma grande variabilidade e severidade de fenótipos.

Figura 3: Perfil cromatográfico dos aminoácidos intra-leucocitários.



A seta indica o local onde a cistina (CYS) elui (C) - Perfil de um doente com cistinose (D) - Perfil de um indivíduo normal.

Tabela 1: ↓ Correlação entre o genótipo, valor de cistina intra-leucocitária à idade do diagnóstico e forma de apresentação da cistinose nos doentes estudados.

| Mutação encontrada (alelo1/alelo2) | Doentes | Valor da cistina intra-leucocitária ao diagnóstico (nmol½cistina/mg proteína) | Forma de apresentação da cistinose |
|------------------------------------|---------|---|------------------------------------|
| Deleção de 57-kb/Deleção de 57-kb  | (n=5)   | [2,8-8,0]   | Forma Infantil Nefrótica           |
| Deleção de 57-kb/Q128X             | (n=2)   | [1,5 e 5,1]   | Forma Infantil Nefrótica           |
| Deleção de 57-kb/p.T7FfsX7         | (n=1)   | [7,3]   | Forma Infantil Nefrótica           |
| p.S139F/p.S139F                    | (n=1)   | [1,7]   | Forma Juvenil (tardia) Nefrótica   |
| Deleção de 57-kb/S139F             | (n=2)   | [2,2 e 3,7]   | Forma Juvenil (tardia) Nefrótica   |

Outro facto relevante é que na coorte estudada, não tivemos nenhum doente com a forma não nefrótica ou ocular da doença (tabela 1), o que pode por um lado sugerir, a dificuldade que é muitas vezes de diagnosticar a cistinose e levar a que muitos oftalmologistas não suspeitem logo desta doença como causa dos sintomas, e por outra, a raridade desta forma de apresentação.

De salientar também a extrema importância de um diagnóstico atempado desta doença, que poderá fazer a diferença no *outcome* dos sintomas e da resposta ao tratamento com cisteamina oral (Cystagon®) ou tópico local (Cystadrops®), atenuando assim os efeitos da síndrome de Toni-Debré-Fanconi e um substancial atraso na progressão da degradação glomerular. A progressão da doença renal, as complicações extrarenais e uma diminuição da esperança de vida são sem dúvida mais evidentes, em doentes que não aderem ao tratamento.

## Conclusões

Foram identificadas quatro mutações no gene *CTNS*: uma grande deleção (57-kb), uma pequena deleção (c.18-21delGACT) que origina uma proteína truncada (p.T7FfsX7), uma mutação *missense* (p.S139F) e uma mutação *nonsense* que origina um codão *stop* prematuro (p.Q128X). A deleção de 57-kb é a mutação mais comum encontrada na população portuguesa (68,2%). Desta forma, é essencial que o rastreio desta mutação seja o primeiro a ser efetuado no estudo do gene *CTNS*, bem como a determinação da cistina intra-leucocitária uma vez que esta será

uma ferramenta indispensável na monitorização terapêutica e no diagnóstico da doença. É, no entanto, necessário ter atenção que em crianças muito pequenas a quantificação da cistina intra-leucocitária, pode originar falsos negativos. O diagnóstico precoce desta doença, é fundamental para evitar a instalação de lesões irreversíveis, pois a terapêutica específica pode retardar a progressão da doença.

O estudo genético da cistinose é um estudo pioneiro em Portugal e permitirá o aconselhamento genético e o diagnóstico pré-natal em doentes com cistinose nefrótica na população portuguesa.

Artigo original publicado em inglês: Ferreira F, Leal I, Sousa D, et al. *CTNS Molecular Genetics Profile in a Portuguese Cystinosis Population*. *Open J Genet*. 2018 Dec 18;8(4):91-100. doi:10.4236/ojgen.2018.84008

## Referências bibliográficas:

- (1) Abderhalden E. Familiare cystindiathese. *Z Physiol Chem*. 1903;38(5-6): 557-61.
- (2) Town M, Jean G, Cherqui S, et al. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet*. 1998;18(4):319-24.
- (3) Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. *N Engl J Med*. 2002;347(2):111-21.
- (4) Ariceta G, Camacho JA, Fernández-Obispo M, et al. Cistinosis en pacientes adolescentes y adultos: recomendaciones para la atención de la cistinosis. *Nefrología*. 2015;35(3): 227-346. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2015.05.019>
- (5) Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis [Em linha]. IN: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al (eds). *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, 1993-2019. (consult. 15/03/2019). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1400/>
- (6) Levchenko E, de Graaf-Hess A, Wilmer M, et al. Comparison of cystine determination in mixed leukocytes vs polymorphonuclear leukocytes for diagnosis of cystinosis and monitoring of cysteamine therapy. *Clin Chem*. 2004;50(9):1686-8. <http://clinchem.aaccjnl.org/content/50/9/1686.long>

artigos breves\_ n. 10

- (7) Anikster Y, Lucero C, Touchman JW, et al. Identification and detection of the common 65-kb deletion breakpoint in the nephropathic cystinosis gene (CTNS). *Mol Genet Med.* 1999; 66(2):111-6.
- (8) Touchman JW, Anikster Y, Dietrich NL, et al. The genomic region encompassing the nephropathic cystinosis gene (CTNS): complete sequencing of a 200-kb segment and discovery of a novel gene within the common cystinosis-causing deletion. *Genome Res.* 2000; 10(2):165-73. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310836>
- (9) Forestier L, Jean G, Attard M, et al. Molecular characterization of CTNS deletions in nephropathic cystinosis: development of a PCR-based detection assay. *Am J Hum Genet.* 1999;65(2):353-59.
- (10) Anikster Y, Lucero C, Guo J, et al. Ocular non-nephropathic cystinosis: clinical, biochemical, and molecular correlations. *Pediatr Res.* 2000; 47(1): 17-23.
- (11) Kiehnopf M, Schickel J, Gönne BV, et al. Analysis of the CTNS Gene in Patients of German and Swiss Origin with Nephropathic Cystinosis. *Hum Mutat.* 2002;20(3): 237.
- (12) Macías Vidal J, Rodés M, Hernández-Pérez JM, et al. Analysis of the CTNS gene in 32 cystinosis patients from Spain. *Clin Genet.* 2009;76(5):486-89.
- (13) Chkioua L, Khedhiri S, Grissa O, et al. Genetic basis of cystinosis in Tunisian patients: Identification of novel mutation in CTNS gene. *Meta Gene.* 2015;25:144-9.
- (14) Mason S, Pepe G, Dall'Amico R, et al. Mutational spectrum of the CTNS gene in Italy. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(7):503-8.
- (15) Shahkarami S, Galehdari H, Ahmadzadeh A, et al. The first Molecular genetics analysis of individuals suffering from nephropathic cystinosis in the Southwestern Iran. *Nefrologia.* 2013;33(3):308-15. <https://www.revistanefrologia.com/es-linkresolver-primer-analisis-genetico-molecular-personas-X0211699513003255>
- (16) Ghazi F, Hosseini R, Akouchekian M, et al. CTNS molecular genetics profile in a Persian nephropathic cystinosis population. *Nefrologia.* 2017;37(3):301-10. <https://www.revistanefrologia.com/es-linkresolver-ctns-molecular-genetics-profile-in-S0211699517300061>
- (17) Kalatzis V, Nevo N, Cherqui S, et al. Molecular pathogenesis of cystinosis: effect of CTNS mutations on the transport activity and subcellular localization of cystinosin. *Hum Mol Genet.* 2004;13(13):1361-71.
- (18) Gahl WA, Thoene J, Schneider J. Cystinosis: a disorder of lysosomal membrane transport. IN: Scriver CJ, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* New York: McGraw-Hill, 2001, pp. 5085-5108.
- (19) Nesterova G, Gahl WA. Nephropathic cystinosis: late complications of a multisystemic disease. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(6):863-67.
- (20) Pintos G. Cystinosis: from cystine crystals to the cystinosin. *Nefrologia.* 2011;23(Suppl 1):60-70. <https://www.revistanefrologia.com/es/linksolver/ft/ivp/0211-6995/23%20Suppl%201/60>
- (21) Servais A, Morinière V, Grünfeld JP, et al. Late-onset nephropathic cystinosis: clinical presentation, outcome, and genotyping. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(1):27-35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2390982/>
- (22) Attard M, Jean G, Forestier L, et al. Severity of phenotype in cystinosis varies with mutations in the CTNS gene: predicted effect on the model of cystinosin. *Hum Mol Genet.* 1999;8(13):2507-14.
- (23) Thoene J, Lemons R, Anikster Y, et al. Mutations of CTNS causing intermediate cystinosis. *Mol Genet Metab.* 1999;67(4):283-93.
- (24) Kalatzis V, Antignac C. Cystinosis: from gene to disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(11):1883-6.
- (25) Nesterova G, Gahl WA. Cystinosis: the evolution of a treatable disease. *Pediatr Nephrol.* 2013;28(1):51-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3505515/>
- (26) Elmonem MA, Veys KR, Soliman NA, et al. Cystinosis: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2016;11:47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27102039/>
- (27) Ariceta G, Giordano V, Santos F. Effects of long-term cysteamine treatment in patients with cystinosis. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(4):571-578. Epub 2017 Dec 19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6394685/>
- (28) Schneider JA, Bradley K, Seegmiller JE. Increased cystine in leukocytes from individuals homozygous and heterozygous for cystinosis. *Science.* 1967; 157(3794):1321-2.
- (29) Shotelersuk V, Larson D, Anikster Y, et al. CTNS mutations in an American-based population of cystinosis patients. *Am J Hum Genet.* 1998;63(5):1352-62. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1377545/>
- (30) Levtschenko E, van den Heuvel L, Emma F, et al. Clinical utility gene card for: cystinosis. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22(5):1-3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3992566/>
- (31) Heil SG, Levtschenko E, Monnens LAH, et al. The Molecular Basis of Dutch Infantile Nephropathic Cystinosis. *Nephron.* 2001;89(1):50-5.
- (32) Soliman NA, Elmonem MA, van den Heuvel L, et al. Mutational Spectrum of the CTNS Gene in Egyptian Patients with Nephropathic Cystinosis. *JIMD Rep.* 2014;14:87-97. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4213330/>
- (33) Aldahmesh MA, Humeidan A, Almojalli HA, et al. Characterization of CTNS mutations in Arab patients with cystinosis. *Ophthalmol Genet.* 2009;30(4):185-9
- (34) Topaloglu R, Vilboux T, Coskun T, et al. Genetic basis of cystinosis in Turkish patients: a single-center experience. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(1):115-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3501933/>
- (35) Ferreira F, Leal I, Sousa D, et al. CTNS Molecular Genetics Profile in a Portuguese Cystinosis Population. *Open J Genet.* 2018;8(4):91-100.