

DANIELA FARORO GIOVANNETTI

***ACIDÚRIA GLUTÁRICA TIPO I, AVALIAÇÃO CLÍNICA E
ESTUDO MOLECULAR DE CASOS BRASILEIROS.***

APOIO FAEP

CAMPINAS

2004

DANIELA FARORO GIOVANNETTI

***ACIDÚRIA GLUTÁRICA TIPO I, AVALIAÇÃO CLÍNICA E
ESTUDO MOLECULAR DE CASOS BRASILEIROS.***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Genética Clínica*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Denise Yvonne Janovitz Norato

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Carmem Silvia Bertuzzo

CAMPINAS

2004

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Profa. Dra. Denise Yvonne Janovitz Norato

Membros:

1. Profa. Dra. Denise Yvonne Janovitz Norato

2. Profa. Dra. Cristine Hackel

3. Profa. Dra. Eugênia Ribeiro Valadares

Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27.08.04

Para as minhas filhas, Rebecca, Mirella e Fernanda, as razões pelas quais eu luto por um mundo melhor.

Para meus pacientes Hector, e André e seus familiares, que tão inocentemente fizeram a sua doença parecer especial para mim, despertando meu interesse pela acidúria glutárica tipo I. E para Maiara, que alcançou minha alma com seu olhar, me mostrando o caminho para o seu diagnóstico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Deus, que permitiu que eu tivesse filhas saudáveis, e me deu uma grande vontade de abraçar o mundo.

Para minhas amadas professoras Denise, e Carmen, grandes exemplos de coragem, trabalho e determinação. Obrigada por confiarem em mim e não me deixarem desistir do meu sonho.

Ao Fred, companheiro de todas as horas, pelo grande respeito ao meu trabalho, e pela cumplicidade em tudo que fazemos.

Ao meu pai Edson Faroro, por todo amor e cuidado que sempre teve por mim, me fortalecendo pela certeza da impenetrável retaguarda. E especialmente, por ter acreditado na minha capacidade, sem a mínima cobrança, me mostrando qual a essência que devo passar para minhas filhas.

Para minha mãe Maria Angélica, incansável, por sempre ter estado “por perto” em todas as horas que eu precisei. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas, pelos brigadeiros, pelas pipocas, e por repetir todo esse amor como avó.

Queridas Claudia, Sônia e Teresa pela indiscutível ajuda técnica, e pelo jeito tão especial de me fazerem sentir mais segura e confiante nesta jornada.

Para as enfermeiras do Ambulatório de Pediatria da UNICAMP, que tão carinhosamente me recebem e auxiliam toda quarta-feira.

Para o Prof Dr Carlos Steiner, Profa Dra Maria Augusta Montenegro e Profa Dra Iara Duchovni Silva pelas preciosas orientações na minha aula de qualificação.

Para o Dr Rui Pires Oliveira Sobrinho, pela grande inspiração de sua genialidade em doenças metabólicas.

Para Márcia Banin, nutricionista do HC-UNICAMP, que com grande competência, paciência e interesse segue os pacientes dos Ambulatórios de Erros Inatos do Metabolismo, e principalmente pelo seu ombro amigo nas horas certas.

Para Profa. Dra. Maria Teresa Gutierrez e Profa. Dra Carla Franchi Pinto, da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, que permitiram que eu me sentisse fazendo parte da Instituição, e tanto valorizaram meu trabalho.

Para Cíntia, pela paciência e dedicação com a qual me introduziu ao mundo molecular e quase me fez acreditar que DNA existe.

Para Rafael, Léo, Fábio, Elisângela, Isabel, Luciana e Marilza, e a todos do laboratório de Genética Molecular, que atenciosamente me atendiam com simpatia todas as vezes que eu me sentia perdida no meio dos ACs e TGs.

Ângela e Heloísa, do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP, pela exemplar dedicação e inestimável ajuda no seqüenciamento automático.

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani, chefe do serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que à tantos anos nos permite realizar os exames do Ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo da UNICAMP, sem os quais, a maioria dos nossos pacientes não teria seu diagnóstico. Muito obrigada pelo desprendimento pelos exames, sugestões diagnósticas e principalmente por nunca ter exigido nada em troca.

Para o, Prof. Dr. Moacir Wajner, e para a doutoranda Cláudia Cecchin, por me apoiarem no projeto, e fornecerem informações quanto à procedência dos pacientes que tiveram seu diagnóstico através de seu laboratório.

Para o Dr Daniel Carvalho, na época residente de genética da USP- Ribeirão Preto que tão prontamente me enviou as amostras e história clínica de seus pacientes.

Para o Prof. Dr. Erasmo Casela, pelo envio de material de seus pacientes

Para Profa. Dra Ana Maria Martins, Dra Cecília Miccheletti, e Dra Sandra Kyosen, pela grande receptividade, e o “mutirão” para coleta de exames e preenchimento da ficha clínica de seus pacientes. Minha grande gratidão.

Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.

Antoine de Saint-Exupéri em: O Pequeno Príncipe

SUMÁRIO

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xxvii</i>
ABSTRACT	<i>xxxi</i>
INTRODUÇÃO	35
Incidência	37
Histórico.....	38
Quadro Clínico.....	39
Bioquímica.....	44
Patogênese.....	50
Achados Radiológicos.....	54
Diagnóstico.....	57
Tratamento.....	61
Aspectos Moleculares.....	64
OBJETIVOS	67
CASUÍSTICA E MÉTODOS	71
1-Casuística.....	73
2-Procedimentos.....	73
3-Análise Molecular.....	74
Extração do DNA.....	74
PCR.....	75
SSCP.....	77

Seqüenciamento Automático.....	77
RESULTADOS.....	79
Avaliação Clínica.....	81
1-Paciente 1.....	81
2-Paciente 2.....	89
3-Paciente 3.....	92
Análise Molecular.....	98
DISCUSSÃO.....	105
CONCLUSÕES.....	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
APÊNDICES.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

- **AGI** acidúria glutárica tipo I
- **GCDH** enzima glutaril coenzima A-desidrogenase
- **CoA** Co-enzima A
- **EIM** Erros Inatos do Metabolismo
- **DNA** ácido desoxirribonucléico
- **FNT** fator de necrose tumoral
- **NPA** ácido 3-nitro-propiónico
- **CT** tomografia computadorizada
- **Cr** creatinina
- **RNM** ressonância magnética de crânio
- **SSCP** single strand conformation polymorphism
- **GABA** ácido gama amino butírico
- **PCR** reação em cadeia da polimerase (polimerase chain reaction)
- **ADNPM** Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor

LISTA DE TABELAS

		<i>PÁG.</i>
TABELA 1-	Complicações Crônicas da Distonia..... ..	43
TABELA 2-	Valores laboratoriais encontrados em pacientes com AG I.....	48
TABELA 3-	Dosagens de Glutaril-carnitina, Carnitina total e Acil-carnitinas em soro de pacientes com Acidúria Glutárica Tipo I	49
TABELA 4-	Achados radiológicos em pacientes com acidúria glutárica tipo I.....	55
TABELA 5-	Plano terapêutico contínuo para Acidúria Glutárica tipo I..... ..	62
TABELA 6-	Protocolo para prevenção e Tratamento da Crise Encefalopática.....	63
TABELA 7-	Relação da temperatura de anelamento pelo primer/exon utilizado.....	75
TABELA 8-	Iniciadores que foram utilizados na reação em cadeia da polimerase.....	76
TABELA 9-	Informações obtidas através da Ficha de Avaliação Clínica.....	95
TABELA 10-	Comparação do quadro clínico e radiológico de 2 irmãos com AGI.....	97
TABELA 11-	Resultados da análise molecular por SSCP e seqüenciamento....	104
TABELA 12-	Achados clínicos referentes à forma de início, presença de macrocrania e hiper-hidrose.....	108
TABELA 13-	Achado clínico de distonia em relação à literatura.....	109
TABELA 14-	Incidência da mutação R402W em nossa amostra e em publicações prévias.....	110

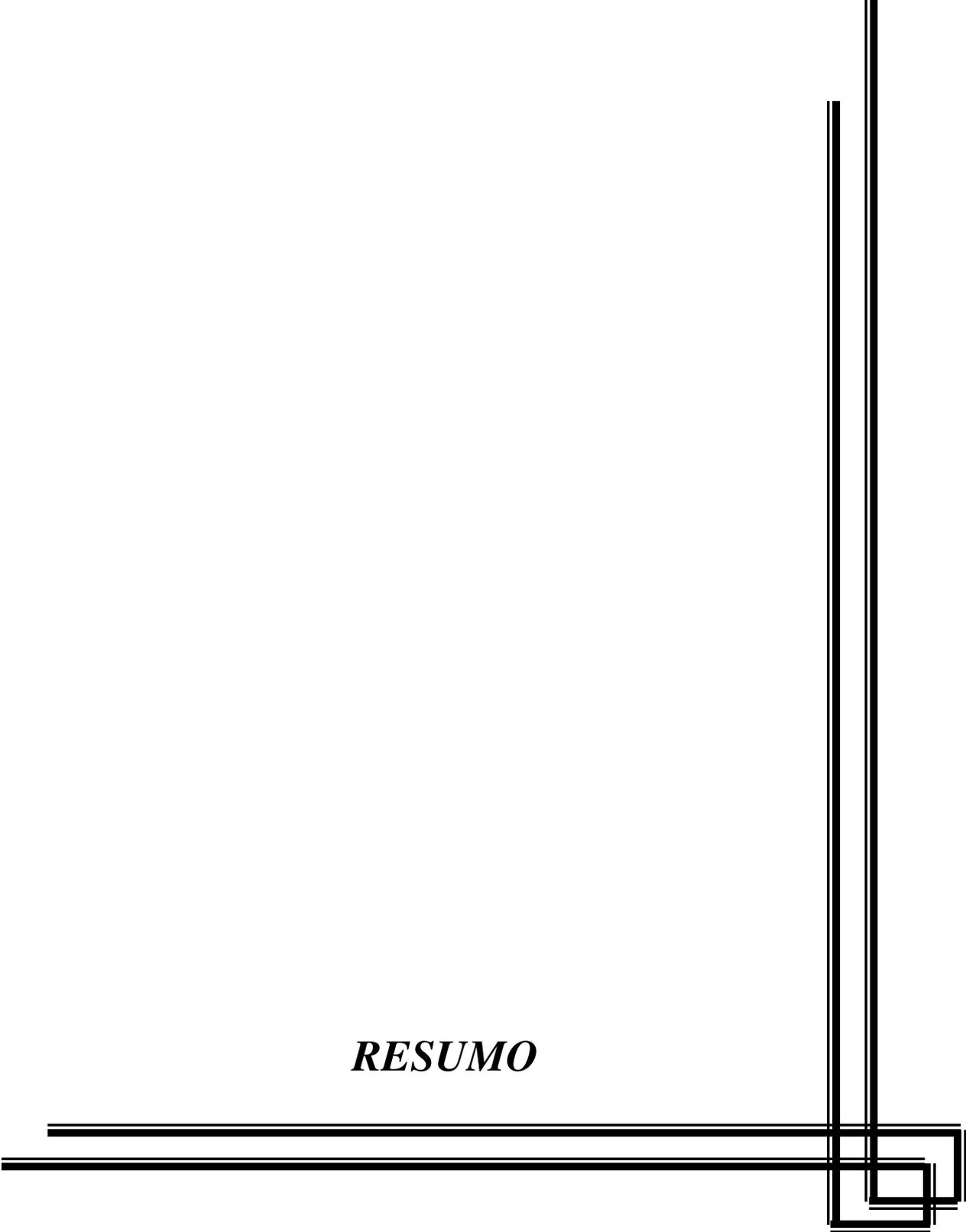
LISTA DE FIGURAS

	<i>PÁG.</i>
FIGURA 1- Via Metabólica da enzima glutaril-CoA desidrogenase.....	46
FIGURA 2- Fluxograma diagnóstico.....	59
FIGURA 3- Paciente 1 com A: 11 meses; B: 1 ano e 6 meses; C e D: 8 anos..	84
FIGURA 4- Paciente 1, Tomografia de crânio logo após crise encefalopática	85
FIGURA 5- Paciente 1, Ressonância Magnética de Crânio(axial).....	86
FIGURA 6- Paciente 1, Ressonância Magnética de Crânio(coronal).....	87
FIGURA 7- Paciente 1, Rx articulação coxo-femoral.....	88
FIGURA 8- Paciente 2, fotos A e B.....	91
FIGURA 9- Paciente 3, segundo aniversário.....	93
FIGURA 10- Paciente 3, terceiro aniversário.....	94
FIGURA 11- SSCP com coloração por prata do éxon 7.....	99
FIGURA 12- Cromatograma do paciente 4, mostrando a presença de duas mutações em homozigose.....	101
FIGURA 13- Cromatograma da paciente 3, mostrando a presença de uma mutação em heterozigose.....	102

LISTA DE APÊNDICES

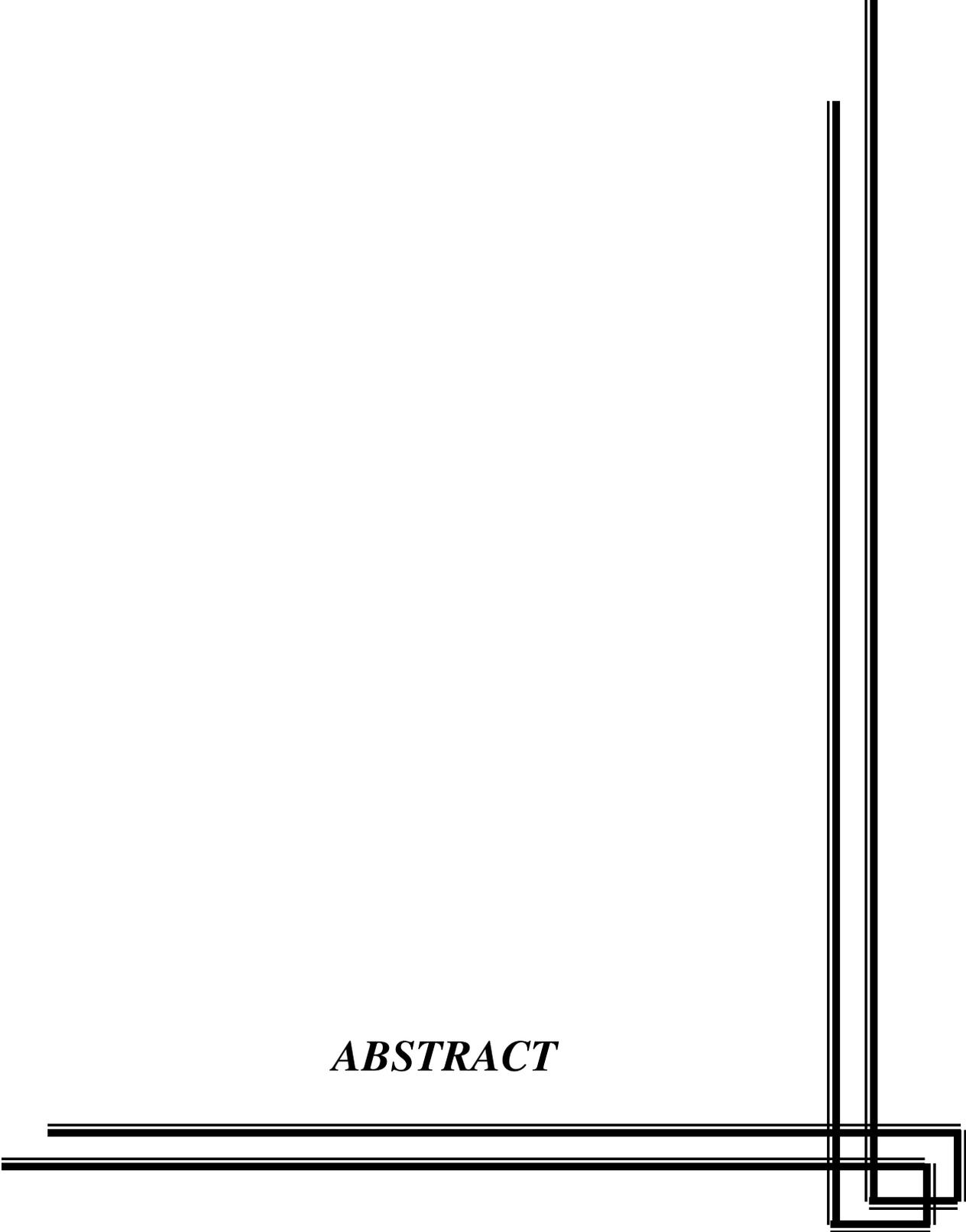
	<i>PÁG.</i>
APÊNDICE I- Termo de Consentimento Livre e esclarecido.....	131
APÊNDICE II- Ficha de Avaliação Clínica.....	133
APÊNDICE III- Correlação dos pacientes e seus números de registro no laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética da UNICAMP.....	135

RESUMO



A Acidúria Glutárica tipo I (GA I) é um erro inato do metabolismo com herança autossômica recessiva, causado por mutações no gene glutaril-CoA desidrogenase (GCDH), que determina a deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase, levando a comprometimento neurológico caracterizado por distonia, com início e evolução extremamente variável. Embora sua incidência estimada seja de 1/30.000 nascidos vivos, muitos pacientes permanecem sem diagnóstico pela dificuldade de suspeição e confirmação laboratorial dessa doença. Este estudo tem como objetivo a caracterização clínica e molecular de 14 casos de acidúria glutárica tipo I, seguidos em instituições brasileiras. Foram incluídos pacientes que apresentavam quadro clínico sugestivo de AGI e positividade do exame de espectrometria de massa de ácidos orgânicos urinários e/ou exame de neuroimagem compatível com esse diagnóstico. Para cada paciente foi preenchido o protocolo padronizado de avaliação clínica e obtido o consentimento informado dos responsáveis e em 13, realizado a coleta de sangue para análise molecular. Foram utilizadas as técnicas de SSCP para triagem de mutações nos 11 éxons e o posterior seqüenciamento automático do DNA para caracterização da mutação. As 13 amostras apresentaram diferentes padrões de migração no gel de eletroforese através da técnica de SSCP, sendo confirmado, através do seqüenciamento automático dos éxons alterados, a presença de nove diferentes mutações, duas delas não reportadas previamente, caracterizando a heterogeneidade molecular em nossa amostra.

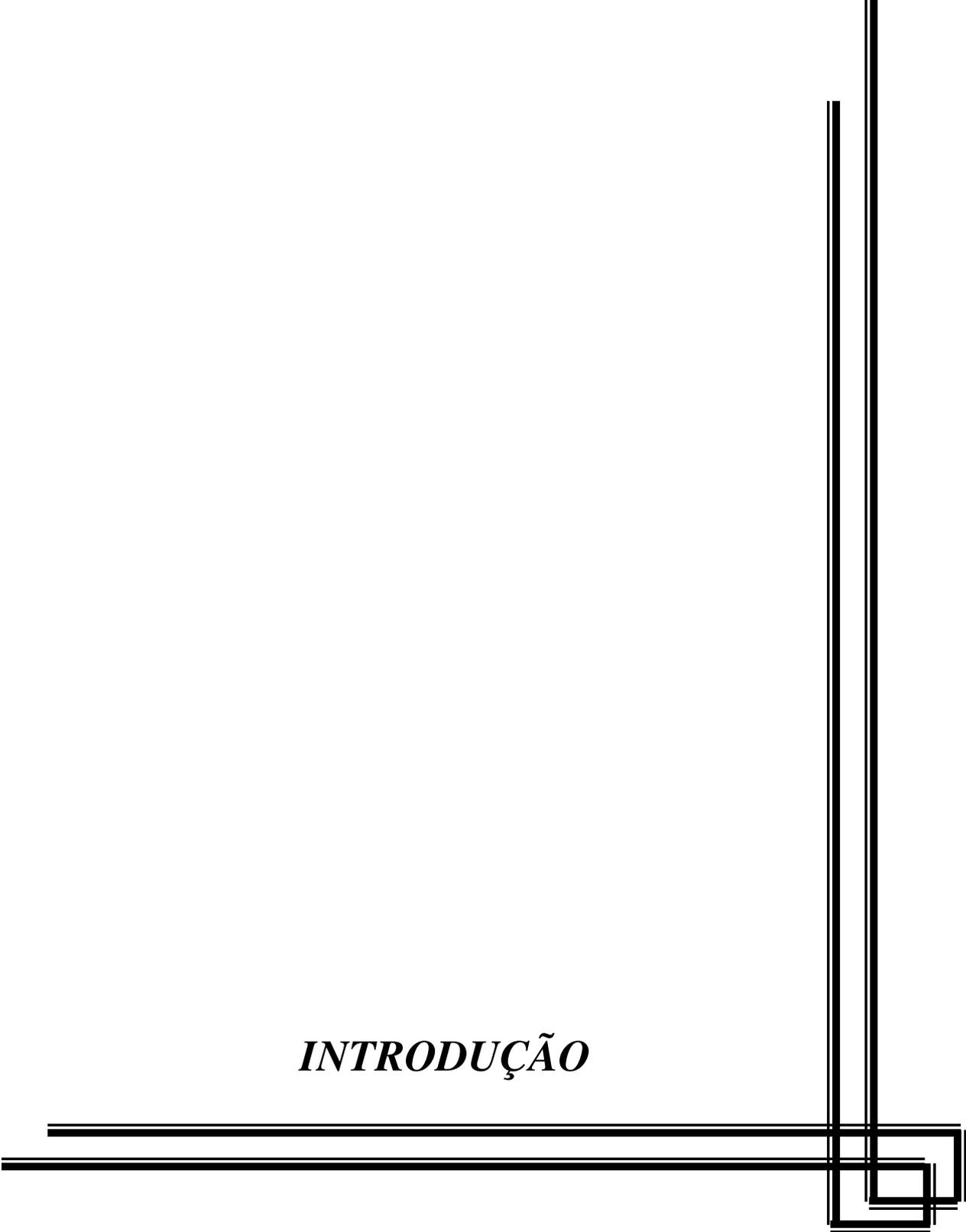
ABSTRACT



Glutaric Aciduria I (GA I), is an autosomic recessive inborn error of metabolism due to mutations in the glutaryl-CoA dehydrogenase(GCDH) gene. The glutaryl-CoA desidrogenase deficiency causes neurological impairment with dystonic postures, with extremely varied beginning and evolution.

Although the estimated incidence is 1/30.000 newborns, many patients are not diagnosed due to the difficulties in suspecting and confirming this disease. This study aims the clinical and molecular characterization of 14 suspected cases of AGI followed in Brazilian institutions. Patients presenting suggestive clinical picture were included if organic acids mass spectrometry was positive or a brain scan showed compatible images. Blood samples were obtained after applying a standardized clinical evaluation protocol and the informed consent was signed by parents of 13 patients. Mutation screening with SSCP for 11 exons and automatic DNA sequencer were used to detect and characterize mutations. The 13 samples showed different migration patterns in SSCP electrophoresis gel and nine different mutations were confirmed by automatic sequencing, two of them previously unreported, characterizing the molecular heterogeneity of our sample group.

INTRODUÇÃO



A acidúria glutárica tipo I (AG I) (McKUSICK 231670), é um erro inato do metabolismo (EIM), decorrente da deficiência da enzima glutaril-coenzima A (CoA)-desidrogenase (GCDH), que atua no catabolismo dos aminoácidos triptofano, lisina e hidroxilisina.

Esse bloqueio metabólico leva ao acúmulo de glutaril-CoA e glutaconil-CoA nas mitocôndrias, que são as organelas responsáveis pela produção de energia das células. Os ácidos glutárico, 3-hidroxiglutarico e glutacônico, além de glutaril-carnitina são encontrados em altos níveis nos tecidos corporais, e são excretados pela urina (HOFFMANN 2000), ocasionando depleção secundária de carnitina (HOFFMANN *et al.* 1991 e 1995).

INCIDÊNCIA:

Há poucos estudos disponíveis sobre a incidência da acidúria glutárica tipo I, o que poderia ser explicado por normalmente não ser incluída nos programas de triagem neonatal, na maioria das vezes não ser cogitada como hipótese diagnóstica, e pela dificuldade de se realizar os exames para sua confirmação, que não estão disponíveis na maioria dos grandes centros.

A incidência da acidúria glutárica tipo I foi estimada por GREENBERG *et al.* (1994) em 1 caso a cada 40.000 habitantes. Entre 1975 e 2000, BJUGSTAD, GOODMAN E FREED (2000), analisaram relatos de 115 casos e estimaram sua incidência na Suécia como sendo semelhante à da fenilcetonúria, de 1 a cada 30.000 nascidos vivos. A mesma incidência tem sido observada em resultados preliminares de um programa de triagem neonatal para organoacidopatias nos Estados Unidos. Em programas similares na Alemanha, no entanto, a incidência parece ser um pouco menor. (HOFFMANN, 2000)

É especialmente comum em índios Saulteaux e Ojibway no Canadá, e entre os indivíduos da antiga ordem Amish em Lancaster, Pensilvânia.

MORTON *et al.* (1991) publicaram um estudo dos 14 casos referidos, na população Amish na província de Lancaster, Pensilvânia, estimando a frequência de heterozigotos em 10%. GREENBERG *et al.* (2002) realizaram durante três anos, triagem neonatal através da análise do DNA para acidúria glutárica tipo I em crianças nascidas em

Manitoba e região noroeste de Ontário, no Canadá, devido ao alto risco da doença nessa população. Foram triadas 1.176 crianças, sendo detectadas 69 heterozigotos e quatro doentes, com as freqüências estimadas de heterozigotos de 1 em 17, e doentes de 1 em 235 nascidos vivos.

No Brasil, no serviço de referência em doenças metabólicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre foram diagnosticados 13 casos de acidúria glutárica tipo I, desde sua implantação em 1990.

HISTÓRICO

Em 1974, GOODMAN *et al.* descreveram dois irmãos, um menino e uma menina, que apresentavam doença neuro-degenerativa, de início por volta dos seis meses de vida caracterizada por opistótono, distonia e postura atetóide, com excreção urinária de glutarato e que apresentavam acidemia. Logo no ano seguinte, GOODMAN *et al.* (1975) publicaram que, a excreção de glutarato urinário aumentava com a administração oral de L-lisina, a qual é metabolizada em glutaril-CoA, e diminuía na vigência de dieta hipoproteica. Demonstraram também em leucócitos, que o glutaril-CoA radioativo não era metabolizado adequadamente, o que seria compatível com a deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase.

BRANDT *et al.* (1978) descreveram uma menina de 10 anos com paralisia cerebral distônica progressiva, com grande quantidade de ácido glutárico na urina. De uma revisão deste e mais 4 casos publicados anteriormente (2 deles por GOODMAN *et al.* em 1975, e 2 deles por GREGERSEN *et al.* em 1977), os autores concluíram que alterações no metabolismo de ácidos orgânicos devem ser suspeitadas em casos de paralisia cerebral distônica. No caso descrito por BRANDT *et al.* (1978), também foram observadas elevação moderada nos níveis de glicina sérica e deficiência na metabolização do glutaril-CoA pelos leucócitos lisados em relação aos controles normais.

MORTON *et al.* (1991) chamaram à atenção para a grande variabilidade clínica da acidúria glutárica tipo I, seus pacientes apresentavam desde encefalopatia aguda e morte súbita, até paralisia cerebral extrapiramidal estática. Sua casuística incluía 14 crianças de uma comunidade Amish em Lancaster, Pensilvânia, um isolado genético descendente de

um pequeno número de famílias suíças que emigraram para região de Lancaster entre 1727 e 1770, na qual foi estimada a frequência de heterozigotos em 10%. A principal hipótese para essa alta frequência é que tenha sido decorrente de um efeito fundador, com o casal John Lapp e sua esposa, que haviam imigrado aos Estados Unidos por volta de 1730, como antepassados comuns a todos, exceto a mãe de um dos pacientes descritos.

O gene GCDH foi mapeado por GREENBERG *et al.* (1994) na região 19p13.2, através de técnica de FISH (hibridização *in situ* por fluorescência). GOODMAN *et al.* (1998) e BIERY *et al.* (1996) estimaram que ele teria 11 éxons e 10 íntrons, com um tamanho total de 7 Kb. O produto gênico é um polipeptídeo de 438 aminoácidos, sendo que os 44 resíduos amino-terminais são removidos após a incorporação da proteína para a mitocôndria.

Até o momento, foram descritas cerca de 100 mutações que levam à acidúria glutárica tipo I e 5 mutações neutras.

CHRISTENSEN em 1994 publicou sua experiência com biópsia do vilo coriônico realizadas em 16 gestações, tendo encontrado quatro fetos afetados.

QUADRO CLÍNICO:

Quando em 1991, HOFFMANN *et al.* chamaram a AG I de encefalopatia distinta, ele se referia ao conjunto de fatores não usuais que a caracterizavam. Se por um lado a macrocefalia está presente em cerca de 60% dos pacientes, o que é considerado um importante fator para o diagnóstico precoce, a doença não cursa com alterações metabólicas significativas, dificultando a oportunidade de associação de seu quadro clínico com erros inatos do metabolismo (EIM), e conseqüentemente atrasando e dificultando seu diagnóstico.

Nesta mesma publicação, referiu que o quadro clínico da AG I pode se manifestar de duas maneiras:

- início insidioso com atraso no desenvolvimento notado logo nos primeiros meses de vida, com progressão para hipotonia, distonia e discinesia;

- crise encefalopática entre 6 e 18 meses de vida, com quadro de sonolência e coma acompanhado ou não de convulsões, seguido, se o paciente sobreviver, por quadro seqüelar distônico-discinético.

O quadro clínico da AG I mimetiza, a evolução seqüelar de uma encefalopatia infecciosa, ou mesmo uma encefalopatia crônica, como o paciente relatado por STUTCHFIELD *et al.* em 1985, que permaneceu por muito tempo com o diagnóstico de síndrome de Leigh e paralisia cerebral. A AG I pode também deixar de ser detectada em populações de crianças e adultos com diagnóstico de paralisia cerebral e/ou retardamento mental, conforme foi referido por KYLLERMAN em 1994.

Em 1995, HOFFMAN *et al.* apresentaram as características clínicas de 21 pacientes, e afirmaram que nas duas formas clínicas, a inteligência da criança permanece normal, com uma marcada discrepância entre o acometimento motor grave e as funções intelectuais quase intactas. Observaram ainda que as crianças que haviam iniciado o quadro clínico mais precocemente apresentavam maior probabilidade de comprometimento mental. Esses autores também chamam à atenção para a identificação da doença, a partir de um quadro clínico típico de uma criança que apresente síndrome distônica-discinética, sendo aparentemente alerta e com suas funções intelectuais preservadas, associado à proeminência da região frontal.

Sem o tratamento, novas crises encefalopáticas podem advir, com deterioração motora progressiva, atrofia cerebral generalizada, mais importante nos lobos frontal e temporal, e em muitos casos evoluindo para o óbito.

HOFFMANN *et al.* ainda citam nessa mesma publicação que apesar de toda gravidade do quadro descrito, existe uma grande variabilidade fenotípica, já tendo sido detectados pelo menos dois adultos homozigotos assintomáticos.

A primeira publicação que mostrou a discordância fenotípica entre irmãos foi em 1977, quando GREGERSEN *et al.* publicaram esse achado na forma de relato de caso. Desde então diversos autores vêm observando e evidenciando essa heterogeneidade.

AMIR *et al.*(1987) descreveram dois pares de irmãos com a doença, que apresentavam atrofia fronto-temporal na tomografia computadorizada. Nas duas famílias, um dos irmãos era clinicamente assintomático.

ANIKSTER *et al.*(1996) relataram que em cinco das famílias descritas em sua publicação, foi identificada a doença em pelo menos um dos irmãos do caso índice, sendo portador assintomático ou apresentando uma forma mais leve da doença, ou mesmo com diagnóstico equivocado de alteração não determinada geneticamente.

RENNER *et al.*(1997) relataram um par de irmãos, com o menino apresentando a crise encefalopática aos sete meses, com seqüela de distonia grave, e sua irmã aparentemente normal aos quatro anos e cinco meses, com exames laboratoriais compatíveis com a doença, inclusive com ensaio em fibroblastos mostrando atividade enzimática ausente. Apesar de sua avaliação neurológica estar normal, o teste de avaliação de Kaufman, estimando seu QI (quociente intelectual) em 90 a 110, associado à discreta deficiência de atenção. Sua avaliação de neuro-imagem, no entanto, mostrou-se típica da doença, com hipoplasia temporal e cistos aracnóides temporo-polares bilaterais. Seus núcleos basais permaneciam intactos.

A história natural da AG-I entre a população Amish da província de Lancaster, e em particular, a extrema variabilidade clínica na história natural da doença entre irmãos, ilustra bem sua diversidade e complexidade, conforme descrito por MORTON *et al.* em 1991.

Os achados neuro-radiológicos típicos contribuem sobremaneira para a investigação diagnóstica, tendo um papel importante inclusive nos casos pré-sintomáticos. MANDEL *et al.*(1991) citam como achados usuais a atrofia fronto-temporal e alteração de núcleos da base, além de uma atenuação difusa da substância branca. Um dos 11 pacientes descritos por HOFFMANN *et al.* em 1991, já ao nascimento, apresentava atrofia fronto-temporal e atraso na mielinização.

HOFFMANN *et al.*(1994) se referem à GA I, e a algumas outras alterações dos ácidos orgânicos como doenças orgânicas cerebrais, para enfatizar esse dado de grande importância na sua suspeição, e pelo fato da AG I ser uma doença metabólica na maioria das vezes silente quanto às manifestações metabólicas sistêmicas como cetose, acidose metabólica, hipoglicemia e hiperamonemia.

Concluem ainda que nessas doenças, só se obtém o diagnóstico através de exames específicos que habitualmente não constam da maioria dos “exames de triagem” solicitados quando se há a suspeita de alterações metabólicas, e, que, perigosamente,

satisfazem à investigação. Assim esses casos teriam seu diagnóstico perdido naquele momento, ficando sem diagnóstico ou sendo diagnosticados tardiamente, quando o tratamento já não surte o mesmo efeito.

De acordo com HOFFMANN *et al.*(1995), os achados clínicos e a evolução natural da doença consistem basicamente em macrocefalia ao nascimento ou se iniciando na lactância, discinesia, distonia, hipotonia, tetraplegia, suores nas mãos e segmento cefálico, crises de hiperpirexia, todas de início insidioso, ou seguindo uma crise encefalopática. Nos episódios agudos ainda podemos encontrar mais raramente, acidose, hipoglicemia, cetonemia e cetonúria, hiperamonemia e alteração hepatocelular discreta. Os estudos de rotina do líquido cefalorraquidiano são normais, mesmo nos períodos de descompensação metabólica.

MANDEL *et al.*(1991) ressaltaram que muitas vezes, mesmo antes da crise encefalopática, as crianças afetadas podem apresentar discretos e inespecíficos sintomas neurológicos tais como hipotonia, irritabilidade e nervosismo. Mas em alguns desses casos descritos, mesmo com exames de neuro-imagem apresentando sinais de atraso na mielinização e atrofia fronto-temporal, houve atraso na investigação metabólica que seria essencial para o diagnóstico.

Quanto à macrocrania, citada freqüentemente em publicações recentes, deve se levar em conta que perde seu valor preditivo quando a atrofia cerebral é substancial, pois nesses casos, a circunferência cefálica apresenta níveis normais, o que pode explicar porque este achado não foi regularmente relatado nas primeiras publicações, que em sua maioria tinham o diagnóstico tardio. Dos pacientes descritos por HOFFMANN *et al.* em 1995, 43% apresentavam macrocefalia ao nascimento e 67% na infância.

KYLLERMAN, em 1994 referiu que de seus 12 pacientes, que compreendiam todos os casos da Suécia e Noruega, apenas 3 apresentavam macrocefalia na infância (2 deles faleceram antes desse período).

STRAUSS *et al.*(2003a) publicaram a história natural da AG I, com base nos 77 casos seguidos na *Clinic for Special Children*, em *Strasburg, Pensilvânia* chamando à atenção para as complicações advindas da distonia, que podem ser observadas em pacientes

com diagnóstico tardio, e podem constituir o quadro clínico e neurológico do paciente encaminhado tardiamente ao serviço, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1-Complicações Crônicas da Distonia em pacientes com AG I modificada de STRAUSS *et al.*(2003a)

Nutrição e Metabolismo	Hipertermia intermitente Distúrbios da mastigação e deglutição
Pele e Dentição	Úlceras de decúbito Dentes mal-cuidados, aumento da virulência de organismos aspirados
Aparelho Esquelético	Luxação e dor Escoliose e deformidades torácicas Deformidades de ossos longos e fraturas Osteoporose por desuso
Vias Aéreas	Reflexos defensivos da via aérea prejudicados Distonia e estridor laríngeo Pneumonia aspirativa Distonia da parede torácica prejudicando os mecanismos respiratórios
Desenvolvimento	Articulação da fala, escrita e linguagem expressiva prejudicados Acesso inadequado a serviços educacionais Dependência absoluta de ajuda para atividades de vida diária.

BJUGSTAD, GOODMAN E FREED, em 2000, fizeram uma coletânea de 42 artigos previamente publicados, no intuito de identificar variáveis que poderiam ser correlacionadas à gravidade dos déficits motores e ao prognóstico evolutivo, uma vez que os marcadores bioquímicos e moleculares não possuíam, em sua opinião, valor preditivo significativo.

A partir desses 115 pacientes descritos, os autores traçaram um panorama mais abrangente da história natural da doença.

Observaram que quanto mais precoce a idade na qual se iniciam os primeiros sintomas motores, mais grave seria o acometimento neurológico e a evolução clínica, e que o início dos sintomas entre seis e nove meses é mais frequentemente associado com doença progressiva e morte. Nos pacientes que apresentam a forma insidiosa da doença, de início

nos seis primeiros meses de vida, o risco de deterioração e morte do paciente é de apenas 4%, enquanto o início dos sintomas entre seis e nove meses tem uma probabilidade maior de prognóstico ruim, sendo observado 28% de morte subsequente. Em pacientes com início após 9 meses de idade, esse risco decresce para apenas 6%.

Relatam ainda que em pacientes com sintomas após a crise encefalopática, a gravidade não está relacionada à idade de aparecimento.

Esse mesmo aspecto foi relatado por BUSQUETS *et al* em 2000, que observaram que 91% dos pacientes que tiveram crise encefalopática apresentavam fenótipo grave, reforçando a necessidade de prevenção de novas crises para se evitar maior deterioração.

STRAUSS *et al.* em 2003 a, referem que crianças com diagnóstico e tratamento precoce, onde não ocorreu a lesão nos núcleos basais, apresentam freqüentemente a queixa de fadiga e intolerância a exercício, além de episódios de hipoglicemia, apesar de o seguimento clínico indicar que os pacientes estariam com dieta equilibrada e eram saudáveis.

Um paciente com início da doença em idade adulta foi reportado por BÄHR *et al.* em 2002. Sua queixa principal era cefaléia há quatro meses, sendo observado, ao exame físico, nistagmo horizontal discreto, lenta diminuição da movimentação motora fina da mão esquerda, além de reflexos osteo-tendíneos hiper-reativos. Considerando suas anormalidades bioquímicas compatíveis, e o estudo molecular do gene GCDH que identificou duas mutações em heterozigose, os autores reforçam as evidências, de que existam outros fatores genéticos ou ambientais que modulam o curso natural da doença.

BIOQUÍMICA

Em pacientes afetados pela acidúria glutárica tipo I, a enzima glutaril-CoA desidrogenase não é produzida, ou não funciona adequadamente. O bloqueio metabólico leva ao acúmulo de glutaril-CoA e glutaconil-CoA nas mitocôndrias. Seus metabólitos como os ácidos glutárico, 3-OH glutárico (3-HGA), e glutacônico atingem altos níveis nos tecidos corporais, sendo excretados pela urina. (HOFFMANN 2000) (Figura1). Essa via metabólica se encerra no ciclo do ácido tri-carboxílico, que é um sistema cíclico de reações

enzimáticas para oxidação de resíduos acetil até CO₂, onde a formação de citrato é a 1ª etapa. (GOODMAN E FRERMAN, 1997)

Conforme observado por STRAUSS *et al.* em 2003, os metabólitos patológicos como o ácido glutárico e 3-HGA podem ser detectados no sangue e urina conjugados à carnitina e glicina. A formação intra-mitocondrial de glutaril-carnitina e sua subsequente excreção através da urina e bile depleta a carnitina corporal. (tabela 3)

HOFFMANN em 2000, também observou que a glutaril-carnitina é um marcador específico para a acidúria glutárica tipo I, podendo ser detectada através de técnicas de espectrometria de massa FAB (FAB-MS), ou espectrometria de massa em *tandem* (Tandem-MS). A análise de acil-carnitinas em papel filtro por essas técnicas é atualmente usada em alguns países para triagem neonatal.

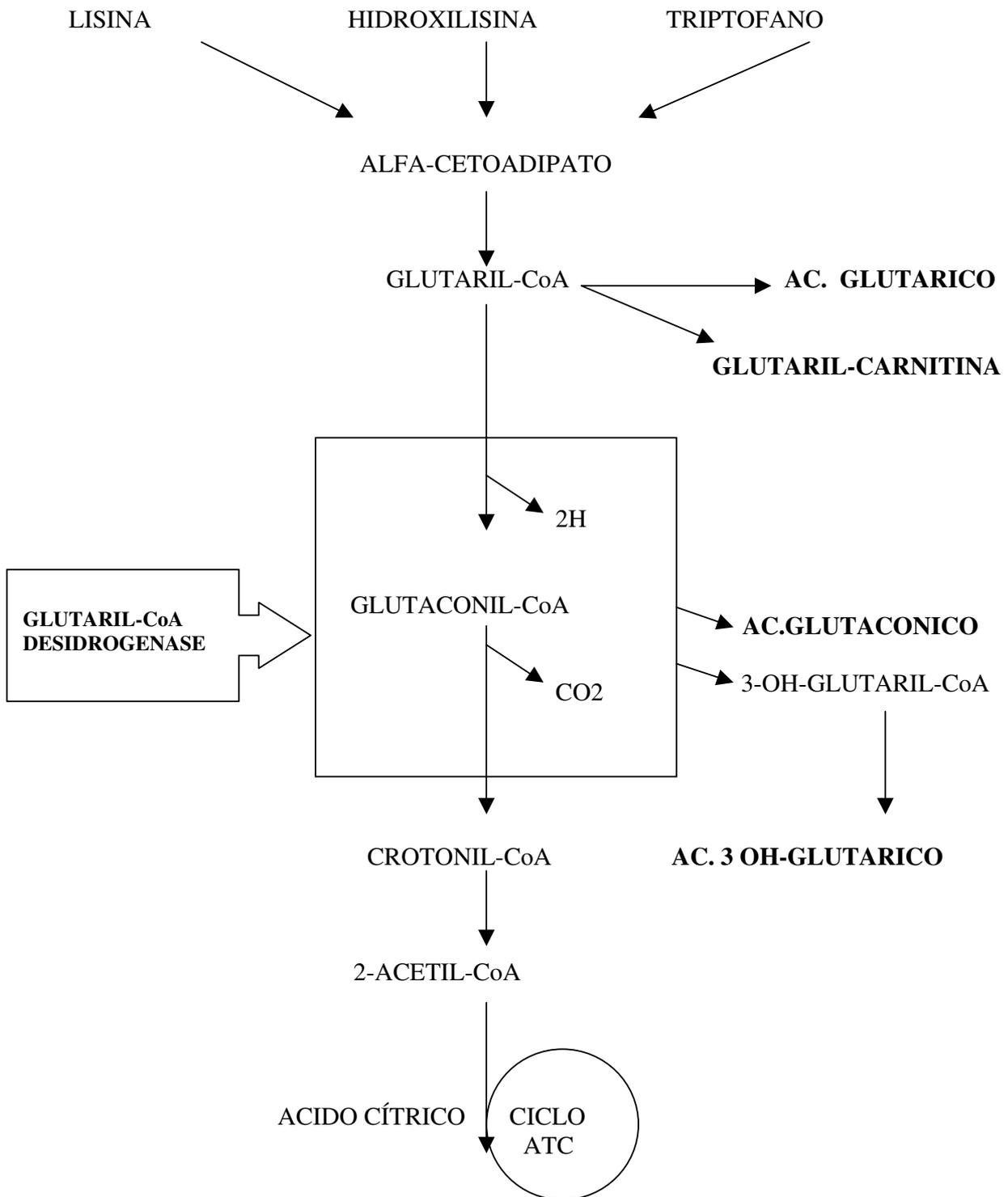


Figura 1-Via metabólica em que atua a enzima glutaril-CoA desidrogenase.

Conforme GOODMAN E FRERMAN em 1997, o perfil bioquímico da AG I na cromatografia de ácidos orgânicos apresenta, classicamente, grandes quantidades de ácido glutárico (mais de 22 mg/mg de creatinina, sendo a excreção normal de menos de 15 microgramas/ mg de creatinina), aumento mais discreto de ácido 3 hidroxiglutárico (mais de 0,7 mg/ mg de creatinina), e ocasionalmente a presença de ácido glutacônico, que pode ser mais proeminente, excedendo inclusive a do ácido 3 hidroxiglutárico (3-HGA), em vigência de cetose. O diagnóstico bioquímico é inicialmente feito com base no aumento de ácido glutárico e 3-HGA na urina e posteriormente confirmado pela deficiência de glutaril-CoA desidrogenase em cultura de leucócitos e/ou fibroblastos, ou pela análise molecular. Pode-se, no entanto, firmar o diagnóstico somente com base na cromatografia de ácidos orgânicos, se esta apresentar aumento significativo de 3-HGA, uma vez que essa substância não é encontrada em nenhum outro EIM.

A análise dos ácidos orgânicos urinários em alguns pacientes pode ser normal, ou mostrar somente discreto aumento. O exame de atividade enzimática e/ou a análise molecular devem ser realizados quando houver forte suspeita da doença, com base em parâmetros clínicos e/ou neuro-radiológicos, a despeito do resultado normal de repetidas cromatografias, conforme recomenda MERINERO *et al.*(1995) e KYLLERMANN (1994).

Os valores do ácido glutárico são altamente variáveis de acordo com o estado clínico do paciente, se comparado com os valores do 3HGA, o que valoriza ainda mais seu achado nos exames. O HGA é, portanto, específico para essa doença e em alguns casos, o único metabólito identificado, no entanto, pode também estar presente em pequenas quantidades em indivíduos normais.

BUSQUETS *et al.* em trabalho publicado em 2000, observou em seus pacientes, o que chamou de aparente discrepância da AG I: O fenótipo grave ser mais frequentemente associado com a alteração bioquímica mais leve.

Nos intervalos das descompensações metabólicas, os ácidos orgânicos urinários podem estar normais ou apenas discretamente alterados, o que, considerando a dificuldade do acesso ao exame de espectrometria de massa de ácidos orgânicos reforça a hipótese de subdiagnóstico (tabela 2).

Conforme descrito por GOODMAN *et al.* (1977), a cromatografia de aminoácidos no sangue e urina é usualmente normal, no entanto, durante episódios agudos de desequilíbrio, o ácido 2-aminoadípico pode estar elevado, podendo ocorrer ainda aminoacidúria generalizada, com picos especialmente elevados de glutamina, ácido glutâmico, ácido 2-aminoadípico e sacaropina. No entanto, como essa alteração pode ocorrer também em pacientes com síndrome de Reye, não se pode considerá-la como critério diagnóstico.

STRAUSS *et al.* em 2003, observaram que neonatos Amish, com AG I, apresentam tipicamente na espectrometria de massa de ácidos orgânicos urinária, grandes elevações de ácido glutárico, moderada de ácido adípico e em menor quantidade de ácido glutacônico e 3 OH-glutárico (HGA), podendo ainda haver elevação do ácido láctico em crianças sob stress fisiológico significativo.

Tabela 2-Valores laboratoriais encontrados em pacientes com Acidúria Glutárica Tipo I, de acordo com STRAUSS (2003a)

	METABÓLITOS	PACIENTES	CONTROLES
URINA µmol/mmolCr	Ácido glutárico	3 - 3500	0 - 45 µmol/kg/dia
	Ácido 3-oh-glutárico	0,2 - 305	Traços
	Razão HGA / GA	0,07 - 5,14	N/A
SANGUE µmol/mmolCr	Ácido glutárico	0 - 6	< 1
	Ácido 3-oh-glutárico	0,01 - 0,1	Indetectável
	Razão HGA / GA	0,01 - 1,72	N/A
Média de Excreção diária µmol/Kg / dia	Ácido glutárico	0,3 - 4000	N/A
	Ácido 3-oh-glutárico	0,1 - 33	N/A

Cr, creatinina; N/A não se aplica

STRAUSS *et al.*, evidenciaram em seus pacientes 3 padrões temporais em relação aos resultados de exames laboratoriais:

1. A maioria das crianças Amish excretam grandes quantidades de ácido glutárico ao nascimento, que declina para níveis normais no primeiro ano de

vida, com uma diminuição quantitativamente mais discreta do ácido 3 OH glutárico.

2. O restante dos pacientes Amish continua a excretar grandes quantidades de ácido glutárico por toda infância.
3. As crianças não Amish seguidas em seu serviço, apresentam valores de ácido glutárico normais ao nascimento, e 3HGA discretamente elevado, com uma razão HGA/AG no plasma e urina sempre excedendo 1.

Conforme observado por STRAUSS *et al.* em 2003, o dano estriatal pode estar associado a qualquer desses padrões de excreção e não coincide sempre com a elevação dos ácidos orgânicos.

Tabela 3-Dosagens de Glutaril-carnitina, Carnitina total e Acil-carnitinas em soro de pacientes com Acidúria Glutárica Tipo I de acordo com STRAUSS 2003a

	METABÓLITOS	PACIENTES	CONTROLES
RECÉM-NASCIDOS	Glutaril-carnitina	0,3 - 0,7 $\mu\text{mol/l}$	Indetectável
	Carnitina total	18 $\mu\text{mol/l}$	15 - 300 $\mu\text{mol/l}$
	Acil-carnitinas	11 $\mu\text{mol/l}$	5 - 60 $\mu\text{mol/l}$
APÓS	Glutaril-carnitina	0,5 - 0,9 $\mu\text{mol/l}$	Indetectável
SUPLEMENTAÇÃO DE CARNITINA	Carnitina total	40 - 60 $\mu\text{mol/l}$	25 - 125 $\mu\text{mol/l}$
	Acil-carnitinas	10 - 20 $\mu\text{mol/l}$	5 - 20 $\mu\text{mol/l}$

O processo de conjugação da carnitina com o ácido glutárico, se inicia intra-útero, o que é evidenciado pelos baixos níveis de carnitina encontrados nos recém-nascidos com AG tipo I observado por STRAUSS *et al.* em 2003a, sendo a base para o teste de triagem neonatal publicado por NAYLOR E CHACE em 1999, que detecta glutaril-carnitina por espectrometria de massa no período neonatal.

A realização dos ensaios enzimáticos apesar de sua importância para a confirmação do diagnóstico, não tem mostrado correlação clínica satisfatória. MIHLHAUSEN *et al.* em 2003, observaram uma criança com fenótipo grave, apesar de apresentar atividade residual da GCDH. Isso reforça a hipótese de que não existe uma correlação genótipo-fenótipo precisa. Neste caso, de diagnóstico tardio, após a crise encefalopática, os autores puderam recuperar o papel filtro no qual havia sido realizada a

triagem neonatal usual. Apesar do tempo transcorrido entre a coleta e o exame, conseguiu-se observar nessa amostra, um aumento da glutaril-carnitina.

PATOGÊNESE

MORTON *et al.*(1991) descreveram 3 irmãos, que tiveram cursos clínicos muito diferentes, e justifica esse achado possivelmente porque tiveram sua crise aguda em diferentes idades. Afirma ainda que os cursos clínicos individualizados da doença nas crianças *Amish* indicam que o dano neurológico é fundamentalmente causado por uma intoxicação episódica do cérebro pelo ácido glutárico ou seus metabólitos durante um estágio precoce e susceptível do desenvolvimento cerebral, não ocorrendo em períodos mais tardios.

O primeiro caso autopsiado, foi curiosamente, um dos pacientes oriundos da descrição original de GOODMAN em 1974, e apresentava alterações crônicas e agudas no putâmem e núcleo caudato conforme descrição de CHOW *et al.*(1987). SOFFER *et al.* (1992) acrescentaram como achados freqüentes na doença a degeneração estriatal e a mielinopatia esponjosa.

STRAUSS *et al.* em 2003b, observaram que o dano estriatal pode estar associado a padrões de excreção diversos, e nem sempre coincide com a elevação da excreção dos ácidos orgânicos.

O grau de deficiência da GCDH não apresenta correlação com a severidade dos sintomas, o que sugere que os fatores ambientais possuem importante papel na patogênese da doença, devendo ser levados em conta o acometimento por doenças intercorrentes, e a dieta com aporte protéico. Isso é reforçado pelo aparente sucesso no tratamento de pacientes pré-sintomáticos, ou pela melhora clínica evidente em pacientes no início da doença conforme descrito por GREENBERG *et al.*(2002), e a melhora relativa após dano estriatal conforme descrito por BENETT *et al.*(1986).

Em trabalho publicado em 2003 com a história natural de 77 casos de GA I, STRAUSS *et al.* (2003a) observaram que, o tratamento nutricional e farmacológico diminui a incidência de insulto estriatal nos pacientes identificados prospectivamente, de 90 para 35

%). A patogênese da AG I foi muito estudada e descrita por esse autor e, apresentamos suas conclusões resumidamente a seguir.

Para compreensão do processo degenerativo na GA I, STRAUSS *et al.*(2003b) referiram obstáculos conceituais quando se tenta aplicar observações *in vitro* no tratamento dos pacientes, e que não existia modelo *in vivo* adequado para experimentos. Em 2002, KOELLER *et al.*, desenvolveram um camundongo com a mutação no gene GCDH, foi observado no entanto, que o modelo é resistente à lesão estriatal mesmo sob stress fisiológico extremo, não contribuindo para a elucidação da patofisiologia da doença humana.

Nessa mesma publicação em 2003b, STRAUSS confrontou a natureza da necrose estriatal aguda com as lesões similares que ocorrem em crianças após eventos hipóxico-isquêmicos ou intoxicação com ácido 3-nitro propiônico (NPA).

Essas condições degenerativas apresentam algumas características em comum:

- O insulto ocorre abruptamente;
- O núcleo estriato é preferencialmente afetado;
- Os achados neuro-radiológicos são idênticos;
- A suscetibilidade ocorre em função da idade, pois se observa que o processo de maturação do cérebro, mais do que a imaturidade *per se*, parece conferir a vulnerabilidade.

STRAUSS sugeriu ainda, um modelo de lesão estriatal que considera as observações *in vitro*, levando em conta as organizações histológicas do cérebro, as interações entre neurônios e astrócitos, os padrões de maturação do estriato nos 3 primeiros anos de vida, as influências potenciais do padrão genético, e do stress ambiental.

Muitas das suas considerações foram especulativas, no entanto, formam atualmente a base do protocolo terapêutico da “*Clinic for Special Children*”, centro de referência para EIM na província de Lancaster, conforme foi descrito por STRAUSS em 2003 a.

Nas acidemias orgânicas, a concentração plasmática de ácidos orgânicos, tipicamente aumenta com a associação com o catabolismo protéico que acompanha os processos infecciosos. No entanto, de acordo com o observado por STRAUSS *et al.* em

2003a, na AG I, os pacientes podem desenvolver uma necrose estriatal grave, mesmo na ausência de elevação significativa da concentração dos ácidos orgânicos. Nessas circunstâncias, um aumento na dinâmica da permeabilidade para-celular da barreira hemato-encefálica sob controle dos mediadores como a histamina, fator de necrose tumoral (FNT), interleucinas, leucotrienos, bradicinina e óxido nítrico, poderiam alterar a biodistribuição dos agentes tóxicos e precipitar uma crise.

Em experiências com animais, uma abertura transitória da barreira hemato-encefálica pode ocorrer, quando em vigência de desidratação, elevação de citocinas locais, produção cérebro-vascular de óxido nítrico, enterocolites, infusão intracarotídea de histamina, lesão endotelial, e outras causas de stress fisiológico. Em humanos, alterações na barreira hemato-encefálica podem ocorrer devido a encefalopatias.

STRAUSS *et al.*(2003b), comentam ainda que a fisiopatologia da necrose estriatal decorrente de isquemia vascular, intoxicação por NPA e AG I, apresenta em comum uma diminuição abrupta da fosfocreatina intracelular, seguida por uma lenta diminuição de ATP (adenosina trifosfato). A atividade neuronal é inicialmente aumentada. Devido às repetidas despolarizações, as células acumulam sódio, cálcio, água e lactato, perdendo potássio e glutatona. O fluido extracelular torna-se então ácido, pelo acúmulo de potássio, glutamato e cisteína.

A barreira hemato-encefálica fica inativa alguns minutos após a isquemia vascular ou a dose de NPA, e o edema das células endoteliais e astrócitos precedem as alterações neuronais. As alterações estruturais observadas na barreira são a translucência do citoplasma, a quebra do cito-esqueleto, o edema mitocondrial e a formação de vesículas de picnócitose. O edema endotelial e das células gliais estreita o lúmen dos capilares, e micro-trombos plaquetários restringem a perfusão tecidual. Nesse momento, o stress oxidativo e a produção de citocinas locais perpetuam a resposta inflamatória local durante e após o insulto metabólico.

STRAUSS *et al.* observaram ainda que o metabólito circulante na AG I, que pode mimetizar os efeitos da lesão estriatal pela NPA, é o ácido 3-OH glutárico (3-HGA), que é elevado em todos pacientes portadores da AG I, possui excreção pouco variável, e é o único metabólito a causar neuro-toxicidade *in vitro*.

In vitro, o edema neuronal e necrose local, formado pelo 3-HGA pode ser prevenido pela presença da superóxido-dismutase e drogas ou anticorpos que bloqueiam os canais catiônicos. Enquanto 3-HGA e ácido glutárico inibem o complexo II *in vitro*, apenas o HGA consegue simultaneamente deprimir a atividade do complexo V, e causar lise celular.

A geometria dos vasos sanguíneos e os padrões de fluxo no núcleo estriado podem contribuir para o risco isquêmico. No entanto, a vulnerabilidade é sem dúvida relacionada às alterações na transmissão sináptica que ocorre nesta região nos primeiros 2 a 3 anos de idade.

No período que vai do nascimento até o 3º ano de vida, a necessidade de glicose e oxigênio triplica, além disso, há um aumento no fluxo sanguíneo na região, por ser uma fase em que há um aumento nas sinapses funcionais.

Em 2000, NISHINO *et al.*, observaram que uma das individualidades do estriado é a massiva convergência de fibras glutaminérgicas e dopaminérgicas, provenientes do neo-córtex e do tálamo intralaminar. Glutamato é o mediador das transmissões sinápticas rápidas, enquanto os receptores de dopamina são modulatórios, modificando tanto os receptores pré-sinápticos, quanto alterando a intensidade das respostas pós-sinápticas.

A atividade funcional sináptica glutaminérgica é o principal determinante da demanda de oxigênio pelo cérebro, Com isso, NISHINO *et al.* em 1997, e MASSIEU *et al.* em 2001, observaram que modificando os sistemas glutaminérgicos e dopaminérgicos pode-se alterar a extensão da lesão tecidual causada pelos inibidores mitocondriais. O uso em animais experimentais de pequenas doses de inibidores do transporte do glutamato no astrócito potencializou a lesão estriatal provocada por NPA. E o volume do tecido lesado por NPA pode ser significativamente reduzido pela de-aferentação estriato-nigral ou administração de agonistas seletivos do receptor de dopamina.

ACHADOS RADIOLÓGICOS

LEIBEL *et al.*(1980) e DUNGAR *et al.*(1984), descreveram o achado de higromas subdurais em tomografias computadorizadas de crânio de pacientes com AG I.

Em 1985, AICARDI *et al.* encontraram hipodensidade de substância branca e dilatação ventricular com alargamento do sulco cortical. AMIR *et al.*(1987), descreveram como achados da doença, a atrofia cortical difusa, alargamento das cisternas mesencefálicas e cornos frontais, com perda do núcleo caudato. O único achado demonstrado nos quatro pacientes descritos em sua publicação foi atrofia fronto-temporal manifestada pelo alargamento das cisternas insulares.

MANDEL *et al.* (1991) observaram em um paciente, a presença, na tomografia computadorizada, de dilatação das cisternas insulares, regressão dos lobos temporais, dilatação tipo “asa de morcego” das fissuras Silvianas e hipodensidade dos núcleos lenticulares. Observaram também, que, algumas vezes, as alterações tomográficas poderiam até preceder o início dos sintomas. No caso descrito nessa publicação, houve melhora na atrofia temporal em tomografia de controle realizada 7 meses após o início do tratamento, o que coincidiu com a melhora clínica. Apesar da descrição de um único paciente, seu levantamento dos achados radiológicos dos casos descritos previamente, fez dessa publicação a primeira descrição abrangente dos achados radiográficos da acidúria glutárica tipo I.

No estudo comparativo publicado em 2000, BJUGSTAD, GOODMAN E FREED. coletaram dados de 42 publicações prévias, abrangendo 115 pacientes com AG I. Seu intento foi, através de uma análise retrospectiva, encontrar fatores preditivos para a progressão da doença. Concluíram que o achado radiográfico de atrofia de gânglios da base e o alargamento do espaço liquórico são fatores preditivos de pobre prognóstico dos pacientes, e que, pacientes com anormalidades de substância branca apresentavam maior gravidade do déficit motor.

Esses autores relatam ainda a incidência das alterações radiológicas, levando em consideração a presença de atrofia cortical, atrofia de gânglios basais, e mensuração dos espaços liquóricos subaracnóides, sulcos e ventrículos, além de qualquer alteração na substância branca, incluindo palidez, atenuação, desmielinização ou formação esponjosa.

Na tabela abaixo (tabela 4), modificada da mesma publicação, está a distribuição dos achados radiológicos observados que puderam ser averiguados, ou seja, que apresentavam condições de serem estimados através de descrição tomográfica, ressonância e/ou anatomia patológica *post-mortem*.

Tabela 4- Achados radiológicos em pacientes com acidúria glutárica tipo I de acordo com Bjugstad, Goodman and Freed.(2000)

Alteração radiológica	Número de casos	Característica	%
Atrofia cortical	74	Ausente	
		Temporal ou frontal	9,2
		Temporal e frontal	0,3
			0,5
Atrofia de gânglios da base	75	Ausente	
		Caudato ou putâmem	4,0
		Caudato e putâmem	1,3
			4,7
Alteração dos espaços liquóricos	75	Ausente	18,7
		1 área afetada	48,0
		2 áreas afetadas	26,7
		3 áreas afetadas	6,7
Alteração na substância branca	75	Ausente	44,0
		Presente	56,0

No tocante à diferenciação da acidúria glutárica de outras doenças neurometabólicas, KOHLSCHÜTTER *et al.* (1994), sugeriu que se levasse em consideração alguns achados neuro-radiológicos e neurofisiológicos:

A tomografia computadorizada (CT) de crânio, apesar de seu limitado valor no diagnóstico das doenças metabólicas, é freqüentemente o melhor método para a avaliação inicial do paciente neuropediátrico, particularmente em emergências como coma e

convulsões. A tomografia pode facilmente mostrar alterações leucodistróficas e calcificações intracerebrais que podem ser importantes pistas para o diagnóstico metabólico.

A ressonância nuclear magnética (RNM) de crânio apresenta sensibilidade superior, sendo uma das vantagens o bom contraste e definição entre as substâncias branca e cinzenta. Isso permite a avaliação da maturação da substância branca e detecção do atraso da maturação que poderia ter causa metabólica. Desmielinização também é facilmente observada na ressonância. Nas crianças muito pequenas, todos os exames de imagem requerem um grande conhecimento dos processos de maturação normais. O reconhecimento das anormalidades da substância branca nas crianças requer especial atenção uma vez que o contraste entre as substâncias branca e cinzenta é fortemente idade-dependente. De 0 a 6 meses, a substância branca em T2 é mais clara que a cinzenta, entre 8 e 12 meses, tem a mesma coloração, sendo mais escura à partir dos 12 meses.

A correlação clínico-radiológica no diagnóstico da acidúria glutárica tipo I deve levar em conta que, sinais neuro-radiológicos tais como macrocefalia, alargamento da fissura Sylviana e atrofia cortical frontal ou temporal podem se iniciar precocemente, mesmo na ausência de qualquer déficit motor. De acordo com as observações de AL-ESSA *et al.* (1998), HOFFMANN *et al.* (1996), AMIR *et al.* (1987) e HOFFMANN *et al.* (1991b).

A degeneração dos núcleos basais, especificamente o caudado e putâmen, se iniciam concomitantemente às restrições motoras, conforme sugerido por FLOTT-RAHMEL *et al.* (1997)

Nos pacientes nos quais, o quadro seqüelar se inicia repentinamente após doença intercorrente, a degeneração estriatal ocorre, quase que imediatamente após, o início da doença. HOFFMANN *et al.* (1996)

Em pacientes com a doença de progressão insidiosa, a atrofia dos núcleos basais ocorre gradualmente, paralelamente aos déficits motores. HOFFMANN *et al.* (1996) e SUPERTI-FURGA *et al.* (1997)

Atraso na mielinização, formação esponjosa e atenuação do sinal da substância branca podem ocorrer mesmo na ausência de déficits motores. HOFFMANN *et al.* (1996)

Outras doenças neurometabólicas devem ser levadas em consideração e investigadas concomitantemente pela gama de doenças e sua tênue diferenciação radiológica. O que pode ser evidenciado na publicação de KOHLSCHÜTTER *et al.* (1994).

A progressão dos sinais neurológicos e neuropatológicos da acidúria glutárica tipo I é altamente variável, mesmo em casos familiares, desse modo, frustrando um prognóstico uniforme, mesmo com o advento do diagnóstico molecular. Conforme exemplificado em MORTON *et al.* (1991), SUPERTI-FURGA *et al.* (1997) e RENNER *et al.* (1997).

DIAGNÓSTICO:

A triagem neonatal da AG I pode ser realizada em serviços particulares no Brasil, através do perfil de acil-carnitinas (espectrometria de massa em Tandem). No entanto, como não está incluída em programas populacionais de triagem neonatal, seu diagnóstico deve ser feito a partir da suspeita clínica, que inclui anamnese e exame físico detalhado, avaliação neurológica e exames de neuro-imagem.

HOFFMANN em 2000 resumiu que a glutaril-carnitina pode estar ausente em pacientes que apresentem análise de ácidos orgânicos urinários normais. Níveis normais de carnitina sérica em pacientes com sinais clínicos inespecíficos deixam o diagnóstico de acidúria glutárica improvável, ao mesmo tempo, se seus níveis estiverem reduzidos, mesmo na ausência de alterações na análise de ácidos orgânicos urinários, a AG I deve ser investigada a nível molecular e/ou enzimático.

A progressão da investigação deve ser realizada idealmente conforme o fluxograma proposto por HOFFMANN em 2000. (Figura 1)

LEHNERT e colaboradores (1994) enfatizam que o primeiro passo para o diagnóstico do EIM é sempre cogitá-lo, alertando-se frente a sinais e sintomas que podem ser inespecíficos e não usuais na anamnese.

KYLLERMAN *et al.* (1994), analisando os casos diagnosticados na Suécia e Noruega, afirmam ainda que a análise de ácidos orgânicos, através da espectrometria de massa, deve ser realizada repetidas vezes, dada a alta taxa de resultados falso-negativos, e compara a prevalência da acidúria glutárica com a da fenilcetonúria devido ao número elevado de casos que se estima não serem diagnosticados corretamente.

Assim, conforme ressaltado por WILSON (1999), deve-se estar atento na anamnese para o antecedente de consangüinidade parental, ocorrência de doença metabólica na irmandade ou outros familiares, involução do desenvolvimento neuropsicomotor, ou mesmo óbito de etiologia não satisfatoriamente esclarecida na irmandade.

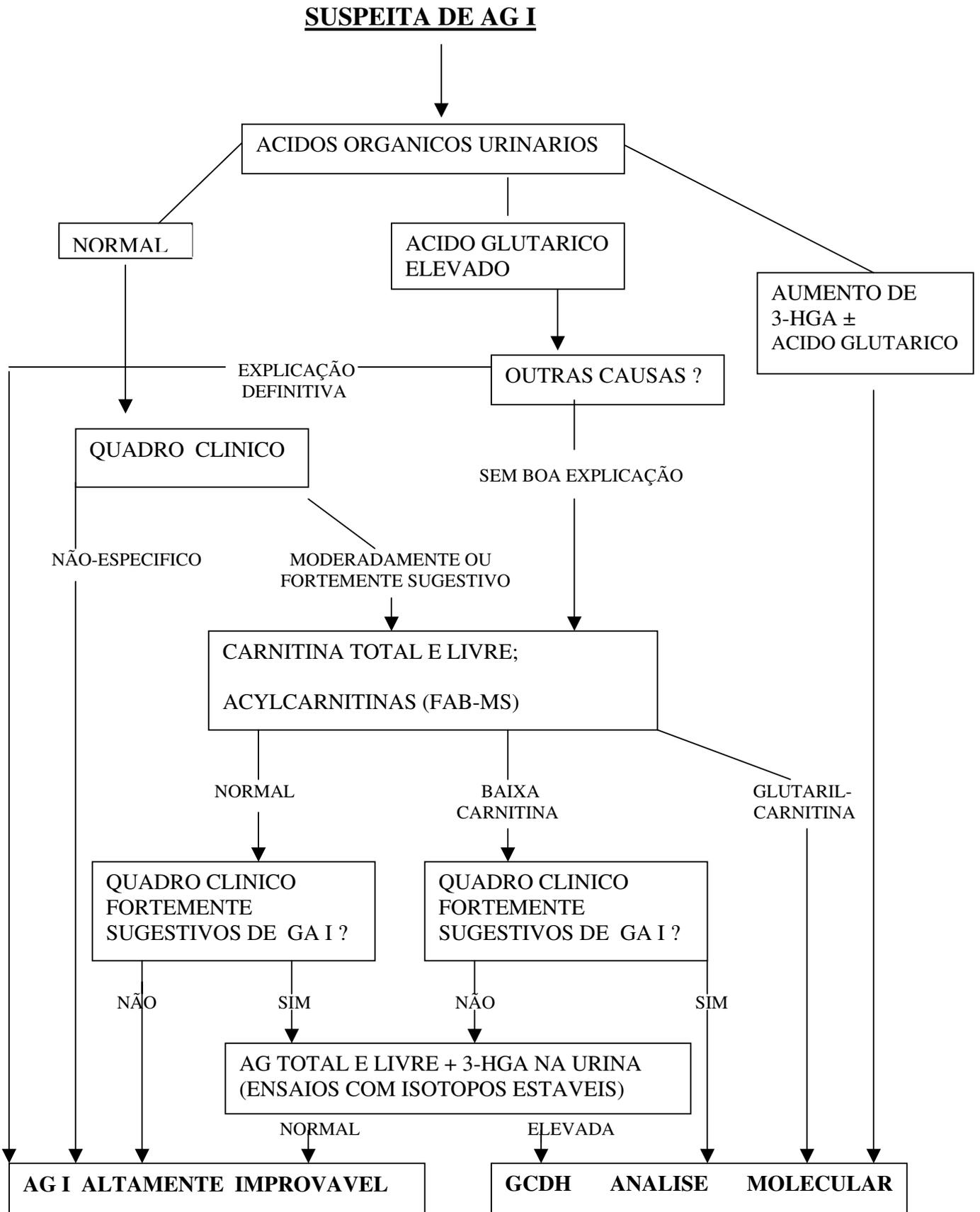


Figura 2-Fluxograma diagnóstico proposto por HOFFMANN (2000)

A identificação de heterozigotos só é possível através de análise da atividade enzimática e dos estudos moleculares, não sendo neles observada excreção de ácido glutárico urinário mesmo após dieta com sobrecarga de L-lisina, que permitisse a identificação pela espectrometria de massa de ácidos orgânicos.

Já em relação ao diagnóstico pré-natal, em 1994, CHRISTENSEN publicou sua experiência com biópsia do vilo coriônico realizadas em 16 gestações, tendo encontrado quatro fetos afetados.

De acordo com o preconizado pelas publicações de LEHNERT *et al.*(1994), HOFFMANN *et al.* (1994), e pelas conclusões de WILSON no Seminário de Genética Médica: Preventive Medicine for Genetic Disorders (1999), o extraordinário progresso da bioquímica e biologia molecular permite, em serviços com livre acesso a esses exames, um diagnóstico preciso que proporciona uma pronta assistência à criança enferma minimizando suas seqüelas neurológicas, além do aconselhamento genético de heterozigotos portadores, diagnóstico pré-natal e pré-implantacional.

Considerando-se a história natural e as múltiplas apresentações clínicas da AG I, sua patogênese, a possibilidade de se alterar o curso da doença com o tratamento precoce e a prevenção de novos casos, que pode se dar através do aconselhamento genético, SUPERTI-FURGA (2003) recomenda que seja implantada a triagem neonatal para a AG I, em sangue de papel filtro, através do perfil de acil-carnitinas, que abrange além da AG I, outras organoacidopatias.

Conforme citado por STRAUSS *et al.* em 2003a, “Enquanto médicos e familiares esperam pelo desenvolvimento de estratégias para reparar genes, crianças continuam a sofrer com a acidúria glutárica tipo I, e a patofisiologia da necrose estriatal aguda permanece desconhecida. Sem o diagnóstico precoce, 80 a 90% das crianças afetadas vão a um serviço de emergência entre 6 e 18 meses de vida com uma lesão cerebral que vai evoluir para uma deficiência permanente. O diagnóstico durante a crise aguda neurológica é atrasada por múltiplos fatores, incluindo a investigação das doenças pediátricas mais comuns, conceitos errados sobre a apresentação aguda das doenças metabólicas, controvérsias sobre triagem neonatal, investigações de maus tratos, e atrasos associados com inter-consultas hospitalares e processamento dos testes laboratoriais”.

TRATAMENTO

De acordo com LYON, ADAMS E KOLODNY (1996), o tratamento pode evitar a crise encefalopática, além de diminuir a frequência e intensidade das crises de descompensação metabólica. Ele consiste basicamente em dieta com níveis controlados de proteína (entre 1 e 2 gramas de proteína /kg), com restrição de lisina e triptofano, suplementação de l-carnitina (100 mg/kg/dia), que é depletada na eliminação dos metabólitos e riboflavina (50 a 100mg/kg), que é a coenzima natural da glutaril-CoA desidrogenase.

SOFFER *et al.* (1992) observou que os ácidos glutárico, glutacônico e 3 HGA inibem a enzima glutamato-descarboxilase neuronal. Observou também que as concentrações de GABA (ácido gama amino-butírico) e a própria atividade da glutamato-decarboxilase neuronal são baixas nos núcleos da base de pacientes com AG I em relação a controles normais. A partir dessas informações, sugeriu que poderia haver melhora na condição clínica com uso de agentes farmacológicos que aumentassem a concentração de GABA no cérebro, como o baclofeno (Baclofen® ou Lioresal®), o que ainda não foi completamente provado.

STRAUSS *et al.*, em 2003 a, publicou a história natural de 77 pacientes, e expôs seu plano terapêutico que foi elaborado a partir das suas observações.

Para as crianças fora de crise, instituiu um protocolo que chamou de *Well-day Diet and Medical Plan*, descrito na tabela 5. Esse plano terapêutico se inicia logo após o diagnóstico, e consiste basicamente em manter a criança em equilíbrio através de medidas dietéticas e médicas. Recomenda ingestão calórica suficiente para o crescimento normal, controle do aporte protéico, dentro da faixa de normalidade, suplementação com L-carnitina, além do uso de uma fórmula com anti-oxidantes lipofílicos, glutamina, creatina e coenzima Q 10.

Para as crianças menores de 2 anos, é sugerido ainda, uma dose profilática de fenobarbital, no intuito de se manter um nível da medicação durante o período de maior vulnerabilidade de necrose estriatal aguda.

Os pacientes são ainda instruídos para que quando apresentarem algum fator de risco adicional, o chamado *sick-day*, que aumente as calorias, e restrinja o aporte protéico. Recomenda-se o uso de ibuprofeno e anti-eméticos para lidar com a febre e vômitos respectivamente

No caso de iminência de crises, usa-se a infusão de dextrose para aporte calórico, rápida correção dos déficits fluidos, carnitina e anticonvulsivantes (fenobarbital, fenitoína), além de midazolam endovenoso, e medidas específicas e inespecíficas para controle dos estados inflamatórios conforme descrito na tabela 6.

Tabela 5-PLANO TERAPÊUTICO CONTÍNUO PARA ACIDÚRIA GLUTÁRICA TIPO I, segundo STRAUSS et al.(2003a).

Componentes Nutricionais	Calorias	100-115 Kcal/Kg por dia
	Proteínas naturais	1-1,25 g/Kg por dia
Suplementações	L-carnitina	100 mg/Kg dia (cada)
	Creatina	
	Glutamina	
	Riboflavina	10 mg/Kg dia (cada)
	Ácido alfa-lipóico	
	Coenzima Q10	8,4 mg/Kg dia
	Ácido pantotênico	5,6 mg/Kg dia
	Ácido alfa linoleico	150 mg/Kg dia
Medicação	Complexo vitamínico	Meio a um tablete por dia
	Fenobarbital	4-6 mg/Kg por dia.

Tabela 6-PROTOCOLO PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA CRISE ENCEFALOPÁTICA. STRAUSS et. al. 2003a

Acesso e estabilização	Monitoramento cardio-pulmonar, oxigenação, hidratação e glicemia. Acesso venoso, correção de hipoglicemia e desequilíbrio hidro-eletrolítico.
Conter o catabolismo	Suspender aporte protéico. Identificar e tratar infecção e/ou alterações inflamatórias (antibióticos e antipiréticos e/ou anti-inflamatórios)
Terapia com dextrose	Dextrose em bolo 0,5g/Kg EV (D 25%, 2ml/Kg; ou D 5%NS, 10 ml/Kg). Seguir com infusão contínua de 8 a 10 mg/Kg/ minuto (usar dextrose a 10 ou 12,5%). Monitorar níveis glicêmicos a cada 6 a 2 horas se necessário. Se houver hiperglicemia e/ou glicosúria, dar insulina de 0,1 a 0,2 U/Kg dose sem reduzir a taxa de infusão de glicose.
Manter débito urinário e alcalinização da urina	Hidratação aumentada de 25 a 50 %, com 4 mEq/Kg dia de Na. Débito urinário maior de 4 ml/Kg por hora. Lasix 0,5 a 1 mg/Kg dose se necessário, para evitar hipovolemia e assegurar débito urinário. Bicarbonato 2 a 3 mEq/Kg/Dia (NaHCO ₃) EV se necessário. Para evitar alcalose sistêmica, manter o PH urinário entre 7 e 8.
Sedação e Neuroproteção	Aporte de L-carnitina 100 mg/Kg EV em 30 minutos. Após, manter mesma dose a cada 6 horas. Fenobarbital 15 a 20 mg/Kg EV. Após manter 2 a 3 mg/Kg dose a cada 12 horas. Fosfenitoína 15 mg /Kg EV. Após manter 3 mg/Kg dose a cada 12 horas.
Considerar terapia com N-acetil-cisteína (NAC) endovenosa	Diluir solução de NAC a 20% em um fluido de dextrose a 1:4 para preparar NAC a 5 %. Dar 140 mg NAC/KG EV por uma hora usando filtro de 0,2 micron. Dar 70 mg/Kg dose EV por 1 hora a cada 4 horas pelas próximas 48 horas. Monitorar sinais e sintomas de anafilaxia.
Considerar medidas para diminuir produção de LCR.	Observar se hidrocefalia estiver distorcendo, ou comprimindo as veias da fossa média Dar lasix 0,5-1 mg/Kg dose EV a cada 6 a 8 horas. Acetazolamida 7 a 10 mg/Kg dose EV a cada 8 horas.

ASPECTOS MOLECULARES

A enzima glutaril-CoA desidrogenase é um homotetrâmero ativo nas mitocôndrias. O monômero é codificado por um gene que foi mapeado por GREENBERG *et al.*(1994) na região 19p13.2. GOODMAN *et al.* (1998) e BIERY *et al.*(1996) estimaram que o gene GCDH tem 11 éxons e 10 íntrons, com um tamanho total de 7 Kb. O produto gênico é um polipeptídeo de 438 aminoácidos, sendo que os 44 resíduos amino-terminais são removidos após a incorporação da proteína para a mitocôndria.

Em estudo realizado na ordem Amish do condado de Lancaster, na Pensilvânia, BIERY *et al.*(1996) encontraram a mutação responsável pela doença nesta população. É a troca de citosina por timina no nucleotídeo de número 1298 em homozigose, resultando na substituição do aminoácido alanina por valina (A421V). Encontraram a mesma mutação em heterozigose em 4 pacientes sem ancestrais Amish, todos esses pacientes com algum ancestral na Europa Central.

Até o momento, foram descritas cerca de 100 mutações que levam à acidúria glutárica tipo I e 5 mutações neutras.

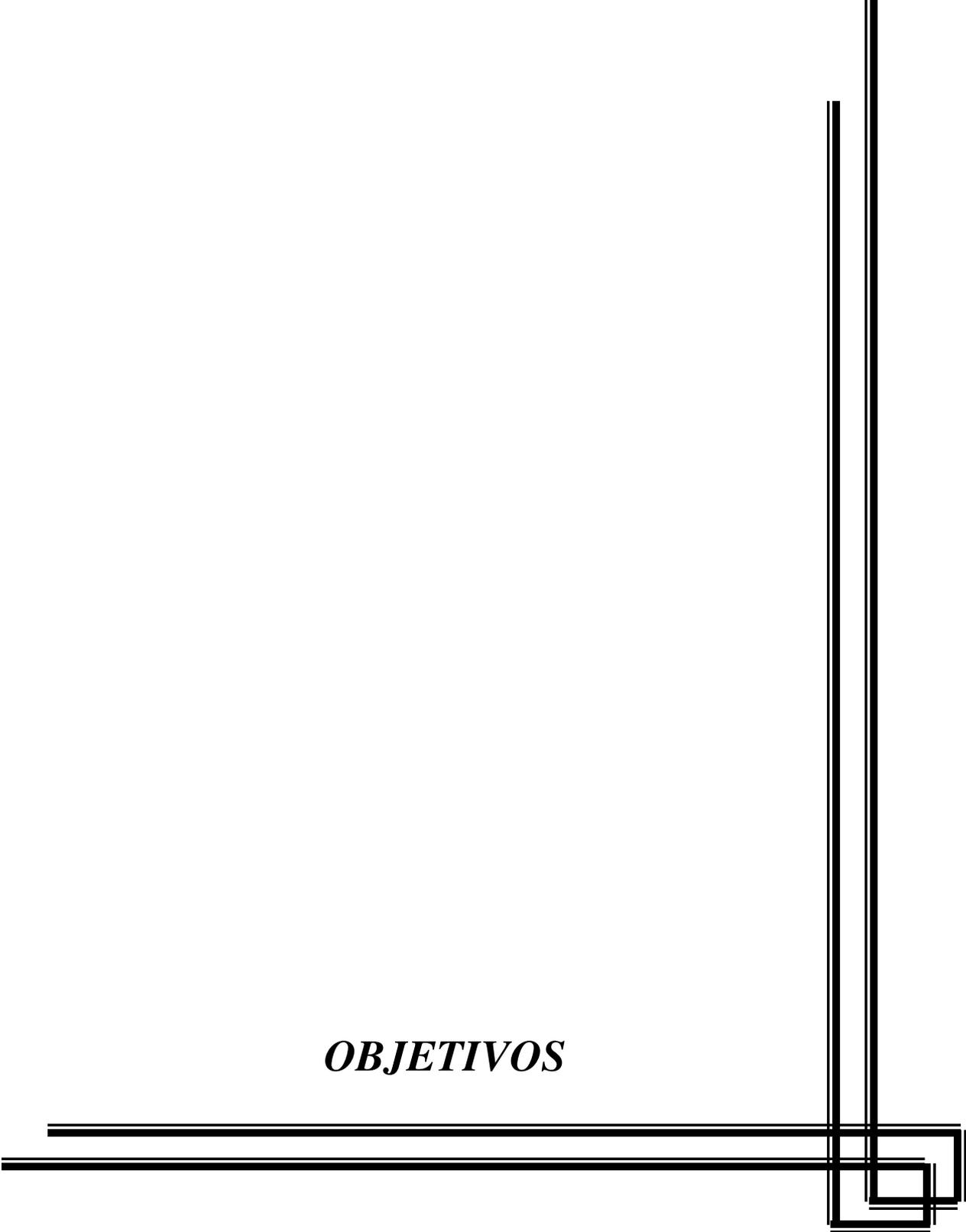
A mutação de maior prevalência identificada foi a R402W, que consiste na troca do nucleotídeo citosina da posição 1240, por uma timina, ocasionando a substituição do aminoácido arginina por triptofano. Estimava-se que essa mutação seria responsável por 20% dos alelos mutantes na Europa, conforme publicação de GOODMAN *et al* (1998). Em 2000, ZSCHOCKE *et al.* puderam observar que essa mesma mutação é responsável por 40% dos alelos nos pacientes de origem alemã.

ZSCHOCKE *et al.*(2000) padronizaram um método que se utiliza de eletroforese em gel de gradiente desnaturante, com SSCP (single strand conformation polymorphism) seguido por seqüenciamento dos éxons alterados, para detecção de mutações no gene GCDH. Obteve 100% de sensibilidade com esses métodos em seus 48 pacientes com diagnóstico confirmado pela análise enzimática. Sua casuística foi composta adicionalmente por pacientes com suspeita clínica de AGI, e estudo enzimático negativo, e nesses pacientes não foi detectada alteração molecular. Identificou um total de 38 mutações, 27 delas encontradas em casos isolados, e 21 delas sem descrição prévia.

Concluíram com isso que a alta sensibilidade desse método permite um diagnóstico rápido e acessível em localidades onde a análise enzimática não está disponível.

Em 2000, BUSQUETS *et al.*, publicou duas mutações novas e cinco mutações reportadas previamente, oriundas de 13 pacientes, 7 deles de origem portuguesa, e 6 deles de origem italiana. As mutações novas reportadas nesse trabalho foram a G390V (1205 G-T), e a X439W (1353 A-G). No Brasil, até o momento, não havia sido realizado nenhum estudo molecular dos pacientes portadores da acidúria glutárica tipo I.

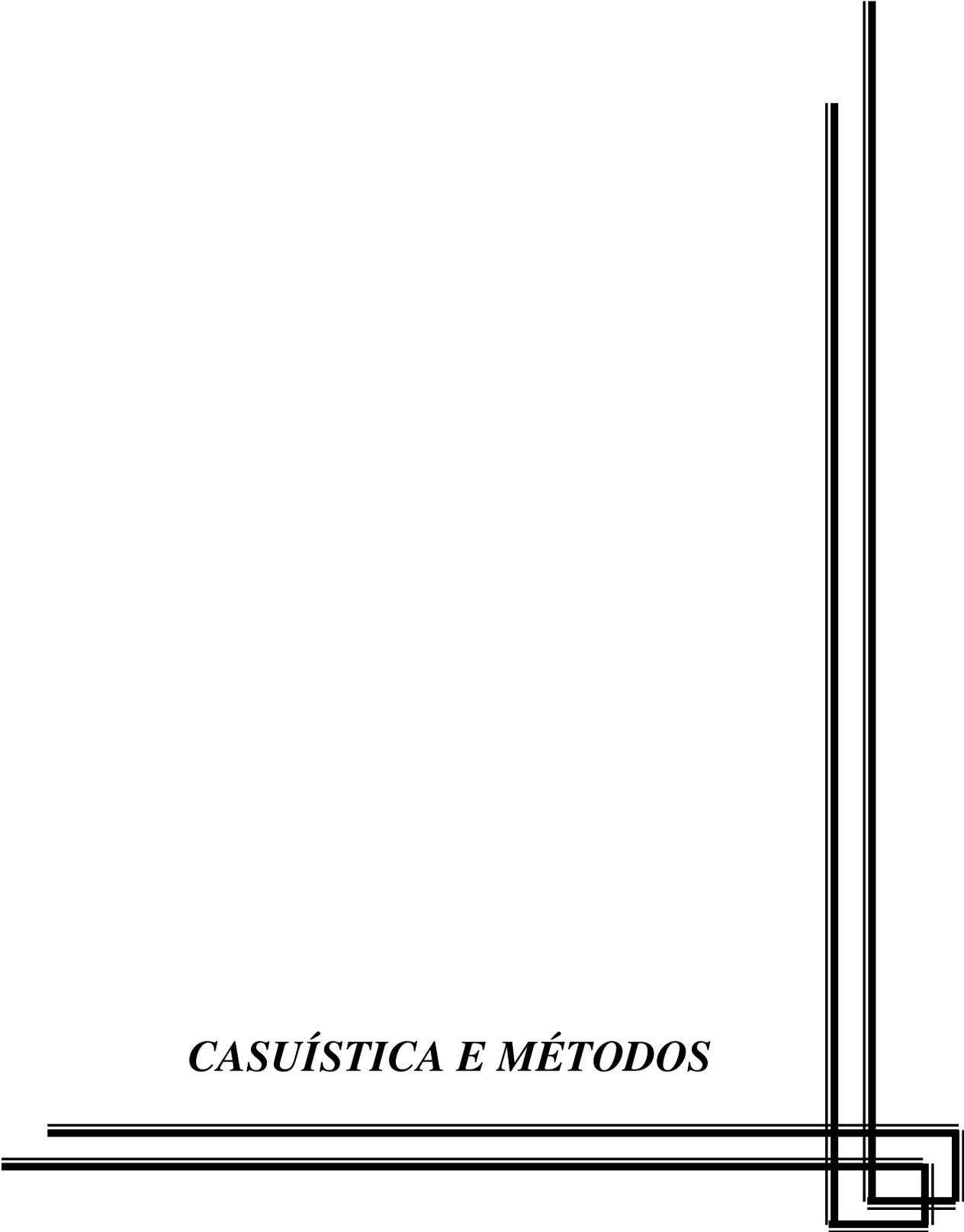
OBJETIVOS



Os objetivos deste trabalho são, em pacientes brasileiros com acidúria glutárica tipo I:

1. Descrever o quadro clínico e radiológico.
2. Realizar o estudo molecular do gene da enzima glutaril-CoA desidrogenase.

CASUÍSTICA E MÉTODOS



1-CASUÍSTICA

A avaliação clínica foi realizada em 16 crianças com a hipótese diagnóstica de AGI, sendo 3 delas acompanhadas no Ambulatório de EIM, do Serviço de Genética Médica, do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2 pacientes no Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (HC R.P.), 7 pacientes provenientes da Escola Paulista de Medicina (EPM), Hospital São Paulo, e 4 pacientes do Instituto da Criança da USP São Paulo (IC USP). Os pacientes provenientes de outros serviços foram identificados através de busca ativa, por contato pessoal com médicos que trabalham em instituições que atendem pacientes com doenças metabólicas, e serviços de referência laboratorial.

Os critérios para inclusão do paciente neste trabalho foram, espectrometria de massa de ácidos orgânicos urinários típica e/ou, a presença de alteração em exame de neuro-imagem compatível com a doença.

2-PROCEDIMENTOS

Os pacientes foram contatados diretamente ou através do médico acompanhante, sendo apresentado o objetivo da pesquisa, apresentado o Termo de Consentimento Informado aos responsáveis.

Em nenhum paciente foi realizada a dosagem enzimática da glutaril-CoA desidrogenase por não estar disponível em nosso país. A indicação do exame ocorreria em pacientes com quadro clínico e radiológico sugestivo, que apresentassem cromatografias de ácidos orgânicos repetidamente normais, no intuito de confirmação do diagnóstico. Como a análise molecular é um dos exames indicados nessa confirmação, e dispúnhamos dela em nosso projeto, tal procedimento não foi considerado.

Os 3 primeiros pacientes foram avaliados e seguidos pessoalmente pela equipe do ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo da UNICAMP, e os demais foram avaliados e acompanhados em outros serviços, sendo que a Ficha de Avaliação Clínica (apêndice III) foi preenchida pelos médicos acompanhantes.

A coleta dos dados referentes aos exames de neuro-imagem dos pacientes foi realizada a partir da transcrição de seu laudo na Ficha de Avaliação Clínica. Exceção feita aos 3 primeiros pacientes aos quais tivemos acesso aos filmes.

3-ANÁLISE MOLECULAR

Avaliamos as informações disponíveis de um total de 14 pacientes, sendo que em 13 deles tivemos acesso ao DNA.

Não foi possível a coleta do DNA da paciente cinco, pois quando entramos em contato com o serviço responsável, ela já havia falecido.

Os primers utilizados nas reações foram extraídos da publicação de ZSCHOCKE *et al.*(2000).

Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico

Coletou-se, em dois tubos *vacutainer*, cerca de 7 mL de sangue periférico de cada paciente (3,5 mL em cada frasco), contendo, em cada um deles, 54 µL de EDTA a 15%, para impedir a coagulação sanguínea. Centrifugou-se a amostra por 10 minutos a 2000 rpm à temperatura ambiente, para a separação do plasma. Em seguida ao sedimento, aliquotou-se 500 µL, em tubos eppendorf de 2,0 mL. A essa alíquota foi adicionado 1,0 mL de tampão de lise celular (Sacarose 320mM, Tris-HCl pH7,5 10mM, MgCl₂ 5mM, Triton 100X 1%). A solução foi então homogeneizada por 10 a 15 segundos e centrifugada a 8000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, por inversão do tubo. Esse processo foi repetido por duas vezes. Ao precipitado formado foi adicionado 395µL de tampão de digestão (Tris-HCl pH 7,5 10mM, 10mM, NaCl 10mM, SDS 0,5%) e 5 µL de proteinase K (20mg/mL). A reação então foi homogeneizada e incubada em banho-maria à temperatura de 55°C. Após 2 horas foi adicionado 200 µL de LiCl 7,5N em cada amostra e as soluções foram levadas a temperatura de -20°C, por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos. Após a transferência, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e o tubo foi invertido até formação de um

precipitado visível. Foi realizada uma centrifugação à 13000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo. Ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 70% e nova centrifugação foi realizada (13000 rpm/5 min). O sobrenadante foi novamente descartado. O DNA obtido foi então secado à temperatura ambiente e ressuspensionado em água estéril. A eficiência da extração foi avaliada em gel de agarose 0,8%.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A triagem das mutações no gene GCDH foi baseada na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) descrita por SAIKI *et al.* (1989), seguida de SSCP, descrito por ORITA *et al.* (1989), e posterior seqüenciamento das regiões alteradas identificadas.

A reação da PCR, foi realizada em um volume total de 50µl, contendo 5µl de tampão 10X da Taq polimerase fornecido pelo fabricante, 0,4 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 400ng de cada iniciador (tabela 8), 0,2 µg DNA genômico e 2 unidades de Taq polimerase. A PCR constou de uma desnaturação a 94 °C por 1 min, seguido por 38 ciclos de incubação 94°C (1 min), a temperatura de anelamento foi variável conforme descrito na tabela 7, dependendo dos *primers* utilizados (1 min) e 72°C (2 min), com uma extensão final feita a 72°C (7 min).

Tabela 7-Relação da temperatura de anelamento pelo primer / éxon utilizado

TEMPERATURA	ÉXONS
51° C	11 b
53° C	7, 8, 9 a, 11 a
54° C	9 b
55° C	3, 4, 6, 10
57° C	5
58° C	1
61° C	2

Tabela 8-Iniciadores que foram utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).

EXON	NOME DO PRIMER	SEQÜÊNCIA
EXON 1	GCDH-1F	TCGTTGCTCCGCTCGCTCTG
	GCDH-1R	AGTCCCTAAACCCCCAGTTC
EXON 2	GCDH-2F	AGTGTGGGGTCTGGGAGTGTG
	GCDH-2R	CGGGCAGCTCTCGGATTCTG
EXON 3	GCDH-3F	GAAGGGAGGGCACAGTGAT
	GCDH-3R	GCGGAGGAGCAGTCTCAG
EXON 4	GCDH-4F	ATAGCCACCCACCTCAAG
	GCDH-4R	AAGGAGGAAGAGGCTTTCAGA
EXON 5	GCDH-5F	TGTCCTTAATTCAGCCCTGTC
	GCDH-5R	GAACTGTCTTCCTTCCACCAG
EXON 6	GCDH-6F	GGCAGCCTTGTGACTTTGTC
	GCDH-6R	AGTCGGTGAGGGGTCTGAC
EXON 7	GCDH-7F	TGGGCAGGTGGTGAACAG
	GCDH-7R	CCGCATCCGCAGGTGAC
EXON 8	GCDH-8F	CTTCCCTGCTTCAGAGTTG
	GCDH-8R	CCACACCCCCAGAGAATC
EXON 9	GCDH-9F-a	GACGGGGTGGGAGAGTG
	GCDH-9R-a	AGCCCATCAAGGACAAGAG
	GCDH-9F-b	GCCTCCCCTCGCTCTTAC
	GCDH-9R-b	CTCCAGGAAGACACAAGGTC
EXON 10	GCDH-10F	GCCCACTGGTCCCTCATTG
	GCDH-10R	TACCCCTCCCCAGACACT
	GCDH-c.1173-R	TACTCGTCAGAAATCCCAGT
EXON 11	GCDH-11F	AAAACCTCAAACCGACTCTGT
	GCDH-11R-a	GAAGCTGCTATTTTCAGGGTAA
	GCDH-11F	AAAACCTCAAACCGACTCTGT
	GCDH-11R-b	CGCCACCTCCCTTTCTAAG
	GCDH-c.1482-F	TCCCTTCTGAAGTCGATC

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

As amostras de PCR foram diluídas, em uma solução de formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% e xilenocianol 0.05%, na proporção 1:4, e posteriormente desnaturadas a 80 – 100°C por 5 min. Desta solução, 1 µl foi aplicado em um gel com o auxílio de um instrumento apropriado.

A corrida do SSCP foi realizada em gel de poliacrilamida não desnaturante a 12% com 0,5% glicerol. As condições de eletroforese foram de 300 V por 12 horas à temperatura ambiente. Os fragmentos de DNA foram visualizados pela coloração do gel em prata que consiste em banhos consecutivos em 20% de ácido acético (5 minutos), 5% formaldeído (5 minutos), água (duas lavagens de dois minutos), 0.4% AgNO₃ (8 minutos), água (duas lavagens de 30 segundos), 2.5% Na₂CO₃ - 0.013% formaldeído (4 minutos) e 5% ácido acético (2 minutos).

Seqüenciamento Automático Mega Bace 1000

Os fragmentos que apresentaram alteração de migração na eletroforese, quando comparados ao controle normal, foram seqüenciados para verificar a existência de alguma mutação. Neste caso, foi utilizado o seqüenciador automático.

MegaBACE 1000, é um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia *Amersham Biosciences*. As reações de seqüenciamento são realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (com *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase*).

A amplificação para seqüenciamento automático foi realizada com o *DYEnamic™ Terminator cycle sequencing Kit* (MegaBACE™) (*Amersham Pharmacia Biotech, Inc Cleveland, Ohio, USA*). Para esta reação foi utilizados 20 ng do produto de PCR purificado, 5 pmol de iniciador sense e anti-sense (em reações separadas), 4 µl da solução *DYEnamic ET reagent premix* e água deionizada estéril (volume final 15 µl). A reação, distribuída em placa própria para seqüenciamento, foi protegida da luz com papel alumínio. Em termociclador automático (GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems), as amostras foram submetidas desnaturação inicial (95°C - 2 minutos) e 30

ciclos, com as seguintes temperaturas e tempos: desnaturação a 96°C - 20 segundos, anelamento a 57°C - 15 segundos, extensão a 60°C - 1 minuto.

O produto da reação de seqüenciamento foi submetido à purificação com 2µl de acetato de amônio 7,5M e 50µl de etanol absoluto aos 15 µl de reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e a seguir foram adicionados 100 µl de etanol 70%. Posteriormente o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão tomando-se o cuidado de não remover o *pellet*. Para completa remoção do etanol, a placa foi submetida à centrifugação invertida a 200 rpm por 5 segundos e finalmente aquecida em termobloco a 65°C por 5 minutos para a secagem das “wells”. Para a eletroforese, adicionou-se 10µl de *loading buffer*, uma mistura de formamida deionizada, 25mM EDTA (pH 8,0) em cada “well”. As amostras foram homogeneizadas, aquecidas a 65°C por 3 minutos e colocadas em gelo para, a seguir, serem colocadas no seqüenciador para a eletroforese.

O gel para a eletroforese é o *MegaBACE Long Read Matrix* com poliacrilamida linear, e as condições de eletroforese foram as seguintes:

- Voltagem de injeção da amostra – 3 kv;
- Tempo de injeção da amostra – 60 segundos;
- Voltagem de corrida – 9 kv;
- Tempo de corrida – 70 minutos;
- Potência do Laser – 40 mW.

A seqüência obtida dos pacientes foi analisada com a ajuda do programa disponível na Internet, “Chromas Pro”, versão 1.15, da Technelysium Pty Ltd.

RESULTADOS

Avaliação Clínica

Dos 16 pacientes avaliados clinicamente, dez deles tiveram a triagem prévia da doença através da espectrometria de massa de ácidos orgânicos, nos outros seis, o exame foi realizado após o início do tratamento, e o resultado foi considerado incharacterístico e insuficiente para preencher os critérios diagnósticos bioquímicos. Destes, quatro casos apresentavam diagnóstico provável de AGI pelo quadro clínico e neuro-radiológico e foram portanto mantidos na amostra. Os dois casos, que não preenchiam os critérios mínimos para inclusão foram retirados da amostra.

Em um paciente (paciente número 5) não foi possível a coleta da amostra de sangue, pois havia falecido na época na qual entramos em contato com o serviço que a seguia. Entretanto, como seu irmão também tem acidúria glutárica, e seus pais cooperaram no preenchimento de sua Ficha de Avaliação Clínica, seus dados foram analisados quanto a variabilidade clínica intrafamiliar. Foi observado entre eles (pacientes número 4 e número 5), aspectos clínicos diversos em relação à forma de apresentação, presença de suor excessivo, hipertermia, e evolução clínica.

Não tivemos acesso a alguns dados clínicos dos pacientes 11, 12, 13 e 14, pois não foram cedidos pelo médico acompanhante.

Os três primeiros pacientes foram avaliados e seguidos pessoalmente pela equipe do ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo da UNICAMP e são descritos a seguir, os demais foram avaliados e acompanhados em outros serviços, sendo que a Ficha de Avaliação Clínica (apêndice III) foi preenchida pelos médicos acompanhantes.

Após a descrição mais pormenorizada dos três pacientes iniciais, como modelo da história natural da doença, eles serão resumidos conjuntamente aos outros pacientes na tabela 9.

1-PACIENTE 1-DATA DE NASCIMENTO: 16/11/1991

Primeiro e único filho de casal jovem e consangüíneo (primos em primeiro grau), de ascendência italiana, naturais do Estado do Paraná. Sem antecedentes familiares relevantes. Seus pais estudaram até nível médio, sendo que apenas seu pai trabalha.

Sua gestação transcorreu normalmente, evoluindo para trabalho de parto prematuro, com parto normal com 36 semanas.

Seu desenvolvimento neuropsicomotor foi considerado sempre dentro dos limites da normalidade, andou com 1 ano e 2 meses, falando pequenas palavras nessa mesma época.

Aos 22 meses, em vigência de quadro infeccioso, apresentou sonolência, evoluindo com quadro convulsivo e coma. Foi encaminhado ainda no período crítico à UNICAMP, que após hemograma e análise usual do líquido cefalorraquidiano terem resultados normais, associado à história clínica de sua mãe que apresentava lesão ativa por HSV (herpes simples vírus) em região oral, suspeitou-se de encefalite herpética, por transmissão materna. Evoluiu com quadro seqüelar de hipertonia, espasticidade e síndrome distônico-discinética.

Manteve seguimento clínico no ambulatório de neurologia infantil, até que houve a suspeita do diagnóstico de acidúria glutárica tipo I sendo encaminhado ao ambulatório de erros inatos do metabolismo (EIM). Foi solicitado então a realização da espectrometria de massa de ácidos orgânicos na urina, através de convênio com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre, apresentando aumento de ácido glutárico.

Prontamente convocado para se iniciar o tratamento. Foi indicada a utilização de riboflavina, na dose de 100 mg por kilo por dia, L-carnitina, na dose de 50 a 100 mg por kilo por dia, além de Depakene® na dose de 10 mg por kilo por dia.

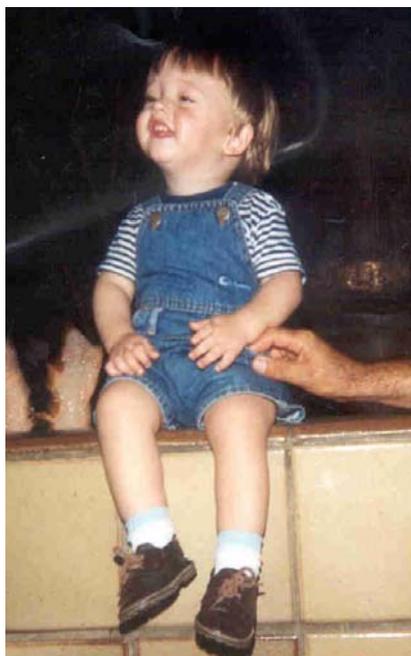
Foi realizada avaliação nutricional no próprio ambulatório de EIM, sendo iniciada dieta hipercalórica e hipoproteica com baixo teor de lisina.

Seus pais referem que após o início do tratamento, vem apresentando maior controle e firmeza nos membros, com melhora progressiva da movimentação involuntária e fala.

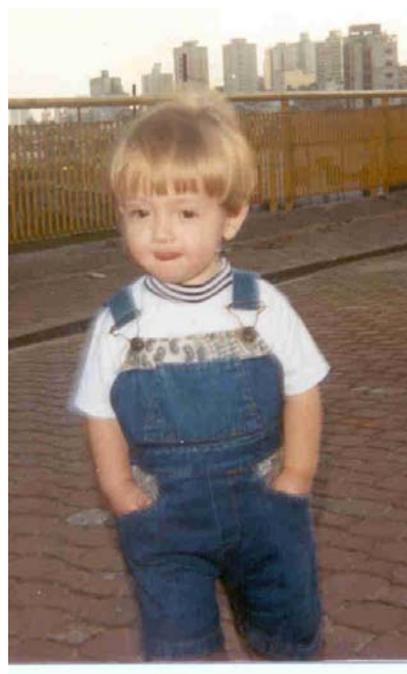
Por motivos familiares, se mudaram para o interior do Paraná, em uma cidade sem muitos recursos em termos de terapias de reabilitação. Não tem, portanto seguimento fonoaudiológico ou fisioterápico que o ajudariam sobremaneira nesta fase. Iniciou seguimento em escola para crianças especiais, onde já está iniciando alfabetização. Mantemos retornos semestrais, dependendo da disponibilidade de locomoção da família,

que se dá através da assistência social do município de origem. Tem retornado rotineiramente na ortopedia e neurologia infantil, onde realiza aplicação de toxina botulínica para minimizar as seqüelas da distonia.

A: Aos 11 meses



B: Aos 1 ano e 6 meses



C e D: Aos 8 anos.



Figuras 3-A, B, C, D: Paciente 1 antes e depois da crise encefalopática

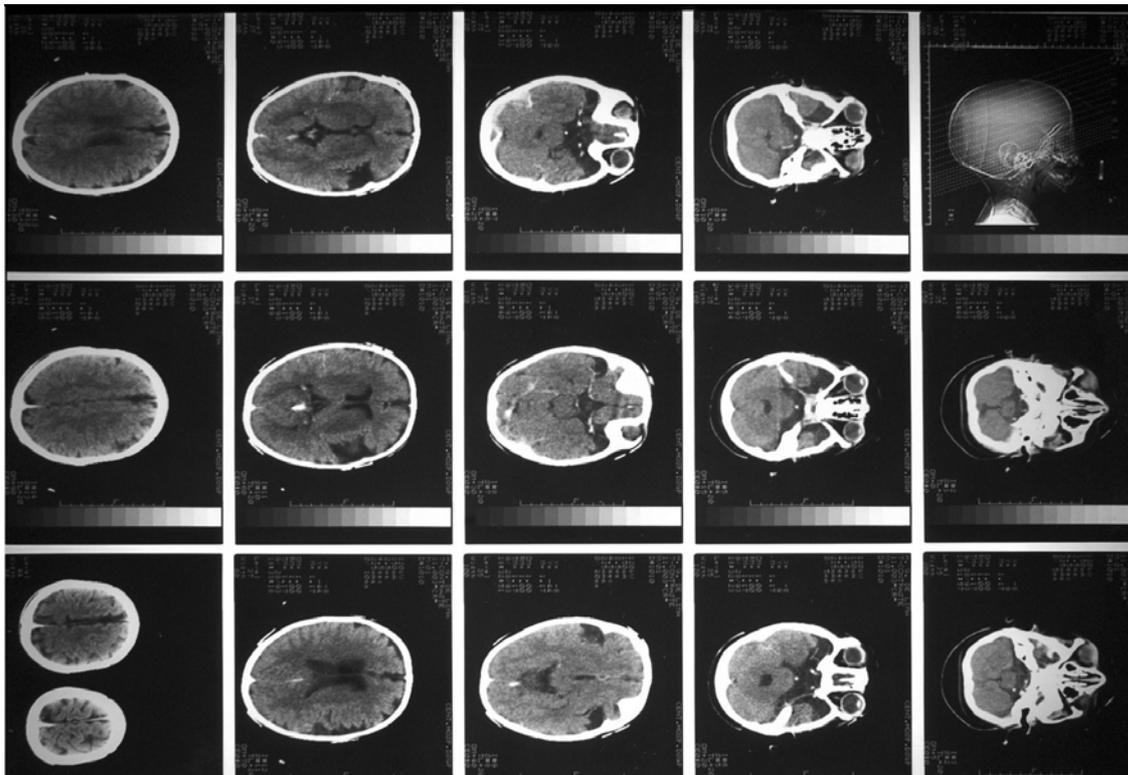


Figura 4-Tomografia Computadorizada de Crânio, Paciente 1. Realizada em 09/1993, quando da crise encefalopática. Já se pode perceber um discreto alargamento de ventrículos, atrofia de lobos frontal e temporal, e sinal hiperintenso em núcleos da base.

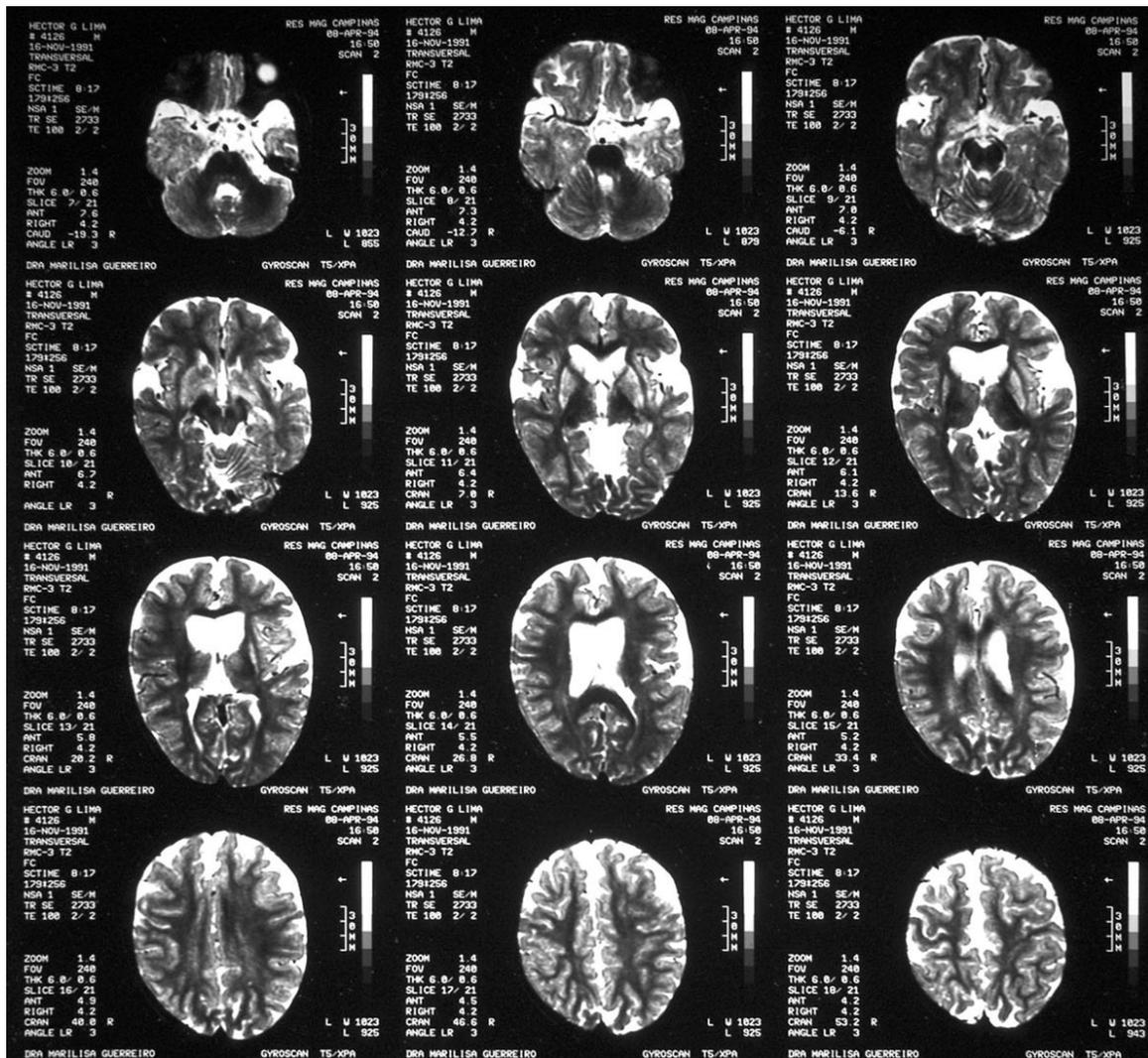


Figura 5-Ressonância Paciente 1, mostrando dilatação ventricular, atrofia de lobos frontal e temporal. Realizada em 04/1994, quando o paciente tinha 2 anos e 5 meses. (axial).

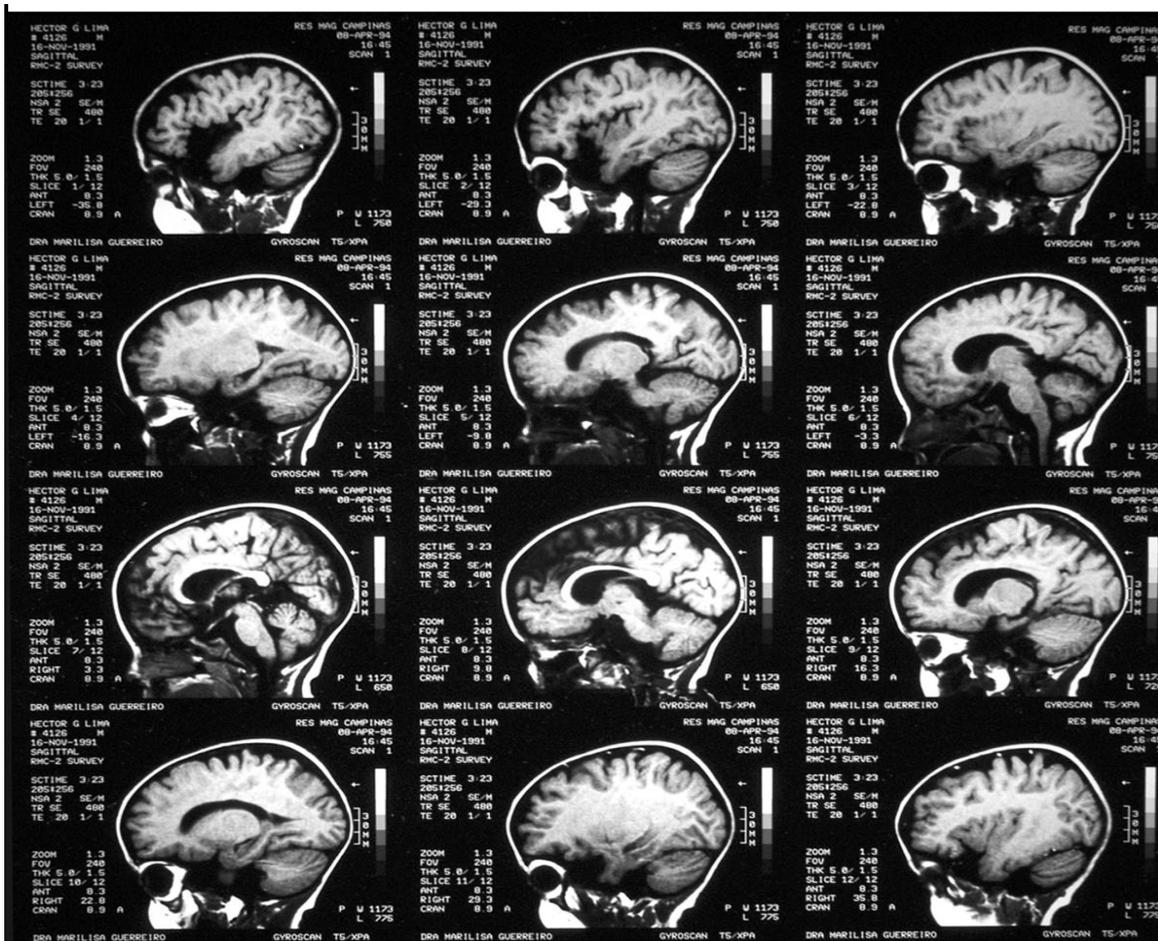


Figura 6-Ressonância Magnética de Crânio, Paciente 1, mostrando dilatação ventricular, atrofia de lobos frontal e temporal, alteração de núcleos da base. Realizada em 04/1994, quando o paciente tinha 2 anos e 5 meses. Coronal.



Figura 7-A e B: Articulação coxo-femoral paciente 1, contratura dos adutores.

2-PACIENTE 2 : DATA DE NASCIMENTO:05/02/1997

Segunda filha de casal jovem, consangüíneo, primos em segundo grau. Seus pais são pardos, de origem nordestina, sem antecedentes familiares relevantes.

Sua gestação não apresentou intercorrências. Seu parto foi normal, à termo, pesando ao nascer 2950 gramas e com índice de vitalidade de Apgar de 9 e 10 respectivamente no primeiro e quinto minutos. Não há informação sobre o perímetro cefálico ao nascimento.

Sua mãe procurou a Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, a criança tinha 7 meses de vida, devido a irritabilidade, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e alterações extra-piramidais. Nessa época foi medido seu perímetro cefálico que era de 44 centímetros e se encontrava próximo ao percentil 75.

Da triagem para a primeira consulta se passou 1 mês, quando foi observado no exame físico que a criança tentava pegar objetos, apresentava movimentação lenta, hipotonia axial, hipertonia apendicular, ausência de clônus e reflexos osteo-tendíneos normais. Na anamnese relativa ao desenvolvimento neuropsicomotor, a criança teve sustento cefálico com 4 meses, rolou na cama aos 7 meses, sentava com apoio e estava começando a engatinhar. Foi solicitado na época retorno em 1 ano.

No retorno com 1 ano e 8 meses, apresentava piora da hipertonia apendicular, com mãos permanentemente fechadas, postura distônica em membros superiores, não pegava objetos, apresentava clônus bilateral e tinha pouco sustento cefálico. Seus reflexos osteo-tendíneos encontravam-se vivos em membros superiores e exaltados em membros inferiores. Nesse momento foi interrogado quadro involutivo.

Foram realizados os seguintes exames após essa avaliação:

- Tomografia Computadorizada de Crânio em setembro/99 que evidenciou lesão extra-axial direita e esquerda, sugestiva de pequenos hematomas sub-durais sub-agudos;
- Avaliação oftalmológica com fundoscopia normal;
- Triagem da Associação de Pais e Amigos do Excepcional de São Paulo (APAE-SP) para erros inatos do metabolismo (EIM), que inclui testes

colorimétricos urinários e cromatografia de aminoácidos com resultado normal;

- Cariótipo com bandas em sangue periférico realizada no Instituto de Genética da Universidade de São Paulo (USP), com resultado normal;

Com 2 anos e 2 meses, em nova consulta, apresentava postura distônica, mantendo pouco sustento cefálico. Seu peso e estatura se encontravam no percentil 2,5, enquanto seu perímetro cefálico de 49,5 centímetros alcançava o percentil 95. Foi então, encaminhada para o Ambulatório de Genética da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

No Ambulatório de Genética, foi levantada a hipótese de patologia de herança autossômica recessiva, que era sugerido pela consangüinidade parental. No seguimento clínico, foram solicitados alguns exames de triagem que não puderam ser realizados. Foi optado então pelo o envio de urina para o Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do HC de Porto Alegre, através do ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo da UNICAMP, cuja responsável na época era a Profa. Dra. Denise Y Janovitz Norato.

O resultado da espectrometria em massa de ácidos orgânicos foi nos enviado em maio de 2002, sendo iniciado o tratamento com riboflavina, na dose de 100 mg por kilo por dia, L-carnitina, na dose de 50 a 100 mg por kilo por dia, além de Depakene® na dose de 200 mg por dia, sendo recomendada dieta com diminuição de proteínas de origem animal. Nessa época, aos 5 anos e 3 meses, a criança sentava-se somente apoiada no carrinho, sustentava a cabeça desde os 4 anos, não falava, não controlava esfíncteres e não segurava objetos.

Devido à condição financeira precária, seu tratamento foi periodicamente descontinuado, mesmo após conseguirmos as medicações através da assistência social da Instituição. A dieta hipoproteica foi suspensa devido novas diretrizes terapêuticas que tivemos acesso na época.

Em setembro de 2003, aos 6 anos e 7 meses, criança já rola na cama, segura objetos e leva-os à boca. Ocorreu melhora do controle do seguimento cefálico e da coordenação após o início da medicação.



Figura 8-A e B: Paciente 2 em dezembro de 2003, aos 6 anos e 10 meses

3-PACIENTE 3: DATA DE NASCIMENTO: 20/01/1998

É o segundo filho de casal jovem, não consanguíneo, com uma irmã mais velha normal. Seus pais são naturais e procedentes de Itu, no interior de São Paulo.

Sem antecedentes familiares relevantes, sua gestação transcorreu normalmente. Seu parto foi cesáreo por iteratividade. Pesou 3345 g, com choro imediato.

Seu desenvolvimento neuropsicomotor foi adequado até que aos 5 meses, quando em vigência de febre, apresentou convulsões seguidas por 4 dias. Em seguida, observou-se quadro de hipertonia e movimentos coreo-atetósicos, com piora progressiva da movimentação involuntária, principalmente em mão direita.

Foram realizados os seguintes exames:

- CT e RNM de crânio, com atrofia temporal;
- Triagem infecciosa com análise de líquido cefalorraquidiano normais;

Aos 3 anos e meio, foi encaminhado para o Serviço de Genética Médica- UNICAMP, apresentando quadro distônico com predomínio em hemi-corpo direito. Apresentava-se eutrófico e com bom contato visual. Foram então solicitados, através do Hospital de Clínicas de Porto Alegre:

- Cromatografia de aminoácidos na urina e plasma com resultados normais;
- Espectrometria de massa de ácidos orgânicos na urina, apresentando presença de 3-OH-3-glutárico, 3-metil-glutacônico, 3-metil- glutárico e 3 metil- crotonilglicina, sugestivo de acidúria 3-OH-3-metil- glutárica;
- Nova espectrometria de massa de ácidos orgânicos na urina, após início de dieta hipoproteica e uso de depakene, riboflavina e carnitina, apresentando aumento moderado do ácido succínico.

Devido à forte suspeita clínica, iniciamos o tratamento com riboflavina, L-carnitina e inibidores do GABA, além de dieta hipoproteica, logo após a coleta da primeira amostra de urina. Atualmente, a dieta foi suspensa, à luz das novas concepções terapêuticas dos últimos anos.

Seus pais referem melhora da coordenação, deglutição e fala após o início da medicação, o que é notório em seu exame clínico.



Figura 9-Segundo aniversário do paciente 3.



Figura 10-Terceiro aniversário do paciente 3

Tabela 9- Informações obtidas através da Ficha de Avaliação Clínica, com identificação, serviço de origem, caracterização clínica, exames subsidiários, informações familiares.

Dados de identificação, caracterização clínica, exames subsidiários, informações familiares de 14 pacientes com Acidúria Glutárica I de acordo com a Ficha de Avaliação Clínica,									
PACIENTE	SERVIÇO	DIAGNÓSTICO	CLÍNICA	NEUROIMAGEM	MACROCRANIA	ALT.NEUROL	HIPERDROSE	CROMATOGRAFIA ÁCIDOS ORGÂNICOS	CONSANGUIDADE PARENTAL
1-HGL	UNICAMP	7 anos	CRISE 1 ano e 10 meses	atrofia fronto-temporal e alt gânglios da base	Pós-natal	Distonia	SIM	COMPATÍVEL	PRIMOS 1º GRAU
2-MOS	UNICAMP	5 anos e 3 meses	INSIDIOSA	Atrofia fronto-temporal e hematomas sub-durais	Pós-natal	Distonia	SIM	COMPATÍVEL	PRIMOS 2º GRAU
3-AVDC	UNICAMP	3 anos e 6 meses	CRISE 5 meses	Atrofia fronto-temporal	NÃO	Distonia	SIM	COMPATÍVEL	NÃO
4-HRS	HC -RP	5 anos	INSIDIOSA	Atrofia fronto-temporal	NÃO	Distonia	SIM	COMPATÍVEL	PRIMOS 3º GRAU
5-ZRS	HC -RP	2 anos e 5 meses	CRISE 1 ano e 2 meses	Alteração de ganglios da base	NÃO	Distonia	NÃO	COMPATÍVEL	PRIMOS 3º GRAU
6-RVN	EPM	2 anos e 7 meses	INSIDIOSA	Atrofia opercular e cisto aracnóide	Pós-natal	ADNPM e epilepsia	NÃO	NEGATIVA (em tratamento)	NÃO
7-GNR	EPM	1 ano e 1 mês	INSIDIOSA	RNM com atrofia opercular e hipersinal gânglios da base	Pós- natal	hiperrreflexia e dist de comportamento	NÃO	NEGATIVA (em tratamento)	NÃO
8-VMMV	EPM	1 ano e 5 meses	INSIDIOSA	CT e RNM -atrofia opercular	Pós-natal	SIM, ADNPM	SIM	NEGATIVA (em tratamento)	NÃO
9- SSC	EPM	2 anos	INSIDIOSA	CT com atrofia opercular e frontal	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA (em tratamento)	PRIMOS 3º GRAU
10-ACVEM	EPM	4 anos e 10 meses	INSIDIOSA	CT e RNM atrofia têmporo-frontal	Neonatal	Distonia leve, ADNPM	SIM	COMPATÍVEL	PRIMOS 2º GRAU
11- RRD	IC-USP	1 ano e 10 meses	CRISE	Atrofia temporal	SIM	Distonia	-	COMPATÍVEL	NÃO
12- DSS	IC-USP	-	INSIDIOSA	Atrofia temporal	SIM	Distonia	-	COMPATÍVEL	NÃO
13- ML	IC-USP	-	INSIDIOSA	Atrofia temporal	SIM	Distonia	-	COMPATÍVEL	NÃO
14-JPMP	IC-USP	-	CRISE	Atrofia temporal	SIM	Distonia	-	COMPATÍVEL	PRIMOS 1º GRAU

A consangüinidade parental foi observada em seis das 13 famílias avaliadas: dois deles eram filhos de primos em primeiro grau, dois filhos de primos em segundo grau, e no caso em que houve recorrência familiar, as crianças eram filhas de primos em terceiro grau.

Os 14 pacientes foram diagnosticados com idade entre 1 ano e 5 meses e 7 anos, sendo que, 11 eram do sexo masculino e três do sexo feminino.

Dentre os 14 pacientes, cinco apresentaram crise encefalopática. A crise ocorreu entre uma idade mínima de 5 meses, e máxima de 1 ano e 10 meses nos dez primeiros pacientes os quais dispúnhamos dos dados. Esses pacientes foram diagnosticados entre 2 anos e 5 meses e 7 anos. Os pacientes que tiveram evolução insidiosa, foram diagnosticados entre 1 ano e 1 mês e 5 anos e 3 meses.

A presença de macrocrania foi observada em dez crianças, sete delas apresentavam manifestação clínica insidiosa, e três delas, crise encefalopática. Alterações relacionadas à sudorese estavam presentes em seis dos dez primeiros pacientes e crises de hiperpirexia foram relatadas em sete pacientes.

Na análise retrospectiva do par de irmãos afetados em nossa casuística, observamos a ocorrência de diversos pontos discordantes, que são apontados mais resumidamente na tabela 10.

O paciente 4 teve seu início da forma insidiosa, com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, apresentou sustento cefálico aos 6 meses, deambulação com apoio e fala de palavras-chave aos 3 anos. A paciente 5, no entanto, sentava-se sem apoio aos 6 meses, e com 1 ano e 2 meses, sem ainda iniciar a deambulação sem apoio, teve uma crise encefalopática. Após a crise, foi observado, quadro seqüelar de distonia e hemiparesia.

Obteve melhora clínica relativa aos 2 anos, após o diagnóstico e início da terapia com carnitina e riboflavina. No entanto, em nova crise encefalopática aos 3 anos e 8 meses, a paciente 5 faleceu.

Ambos apresentavam distonia, mas o paciente 4 foi referido como tendo sudorese excessiva, sem crises hiperpirécicas, enquanto sua irmã apresentava crises hiperpirécicas, sem alteração de sudorese.

O aspecto neuro-radiológico desses pacientes também se mostrava discordante, sendo mais pronunciada a atrofia fronto-temporal no paciente 4 e a alteração de gânglios da base na paciente 5.

Tabela 10- Comparação do quadro clínico e radiológico de 2 irmãos com AG I

PACIENTE	4	5
SEXO	Masculino	Feminino
APRESENTAÇÃO	Insidiosa	Crise com 1 ano meses
ALT. NEUROLÓGICA	Distonia, Hipotonia	Distonia
SUOR EXCESSIVO	Sim	Não
HIPERPIREXIA	Não	Sim
NEURO-IMAGEM	Atrofia fronto-temporal	Alt. gânglios da base
EVOLUÇÃO CLÍNICA	Melhora relativa com início da medicação	Melhora clínica inicial, óbito aos 3 anos e 8 meses em crise encefalopática

Quanto ao quadro clínico neurológico, apenas o paciente 9 é referido como assintomático. Ele está sendo tratado com carnitina e riboflavina desde os 2 anos, quando apresentava hipotonia global, que foi completamente recuperada em sua evolução. Apresentava à tomografia computadorizada de crânio, atrofia opercular e frontal. Foi realizada espectrometria de massa de ácidos orgânicos, no Laboratório de EIM do HC-Porto Alegre, cuja coleta foi em vigência do uso de riboflavina e carnitina, com resultado normal.

Dos treze pacientes que apresentaram alterações neurológicas, dez deles, foram referidos como apresentando distonia. Os outros três casos referiam ADNPM em três deles, um deles associado a epilepsia, outro com hiperreflexia e distúrbio de comportamento, e em outro deles não havia sido explicitado a natureza do acometimento neurológico. Um dos pacientes foi investigado pela presença de macrocrania.

Quanto aos achados de neuro-imagem, obtivemos dados dos 14 pacientes. A alteração mais freqüentemente referida é a atrofia fronto-temporal e temporal, respectivamente em seis e sete pacientes, sendo observado alteração em núcleos da base isolado em um caso, e associado à atrofia fronto-temporal em dois, além da presença de cisto aracnóide associado a um dos casos de atrofia fronto-temporal.

Foi realizada concomitantemente, a análise clínica dos dez pacientes, que apresentaram espectrometria de massa de ácidos orgânicos compatível com AG I. Nesses pacientes, havia uma maior certeza do diagnóstico, apesar de não terem sido realizados exames confirmatórios como a análise enzimática ou estudo molecular.

A distribuição por sexo foi de três pacientes do sexo feminino para sete do sexo masculino, cinco pacientes com apresentação insidiosa e cinco pacientes em que o quadro clínico se iniciou após crise encefalopática.

A macrocrania foi observada em sete dos dez pacientes, a sudorese excessiva ocorreu em cinco dos seis pacientes que tinham esse dado clínico disponível, e em cinco famílias das nove representadas, os pais eram consangüíneos.

Todos os pacientes que apresentavam a espectrometria de massa de ácidos orgânicos compatível com AG I apresentavam também distonia.

Quanto à forma de acometimento, entre os dez pacientes que apresentavam distonia, cinco iniciaram o quadro após crise encefalopática e os outros cinco apresentaram evolução insidiosa.

Análise Molecular:

Na entrada do material no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética da UNICAMP, cada paciente recebeu um número de registro conforme tabela no apêndice III.

Após a extração de DNA pelo método de Cloreto de lítio, foram realizadas análises pela técnica de SSCP manual. Seus resultados encontram-se sumarizados na tabela 12.

Nos pacientes 1, 4, 8 e 10 foram encontradas alterações de corrida no SSCP do éxon 7. Já nos pacientes 2, 4, 10, 12, 13 e 14 foram visualizadas alterações no SSCP relativas ao éxon 10. No éxon 9a, apenas o paciente 12 apresentou alteração de migração no SSCP (Figura 10). Os demais SSCP relativos aos outros éxons não apresentaram alterações de migração

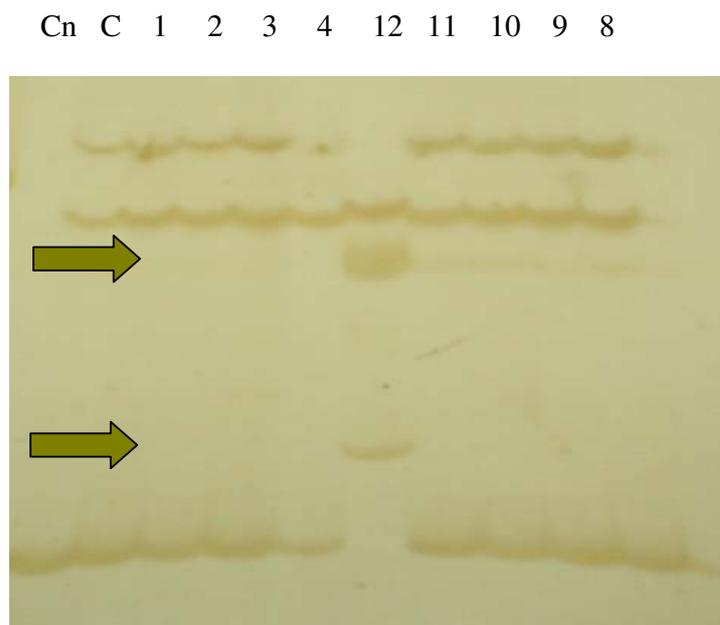


Figura 11-Fotografia de gel de SSCP com coloração por prata do éxon 9a.

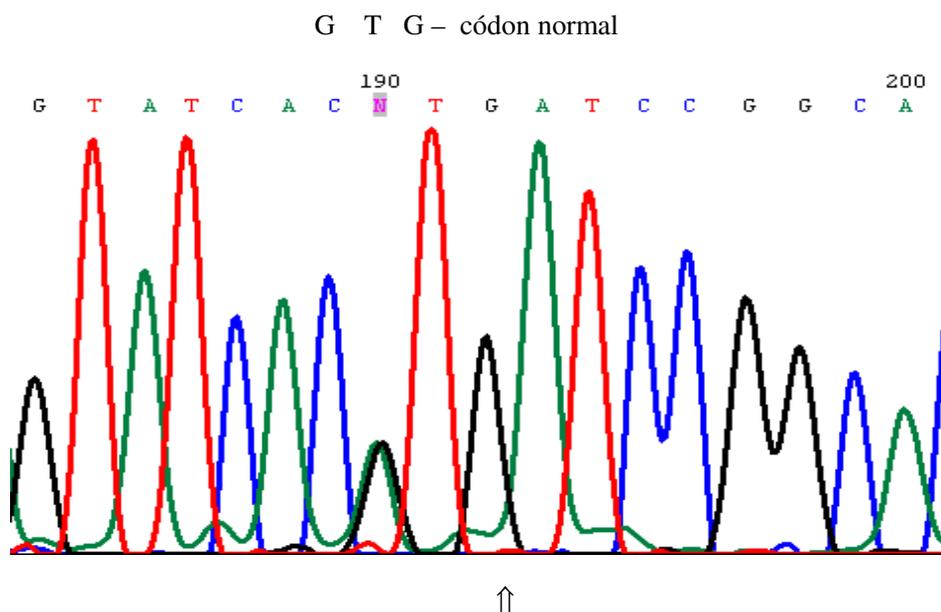
Controle não desnaturado (Cn), controle normal desnaturado (C), pacientes 1, 2, 3, 4, 12, 11,10 , 9 e 8, relativos ao éxon 9a. As setas indicam as alterações de corrida.

Seqüenciamento Automático

Os fragmentos que apresentaram alteração de migração na eletroforese, quando comparados ao controle normal, seriam seqüenciados para se confirmar a existência de alguma mutação, como os resultados de SSCP não se mostraram alterados em todos os pacientes, e dispúnhamos do aparelho de seqüenciamento automático, prosseguimos com o seqüenciamento de todos os éxons dos 14 pacientes. Nos pacientes nos quais não foi encontrada mutação nesse primeiro seqüenciamento, foram repetidos os seqüenciamentos dos éxons 7, 8, 9 e 10, considerados os éxons com maior número de mutações já descritas. Nos pacientes onde havia sido detectada mutação, foi repetido o seqüenciamento do éxon mutado.

As mutações encontradas encontram-se sumarizadas na tabela 13.

Apresentamos na seqüência, os cromatogramas da paciente 4, mostrando a presença de duas mutações em homozigose, que foram observadas no éxon 10, e o cromatograma do paciente 3, com uma mutação em heterozigose também no éxon 10. (figuras 11 e 12)



MUTAÇÃO 1234 G-A, (V400M).

Figura 13-Cromatograma do paciente 3, mostrando a presença de uma mutação em heterozigose, através da co-existência da guanina e adenina na posição 1234, caracterizando a mutação V400M.

Foram identificadas nove diferentes mutações:

G 101 R:

Substituição da guanina por adenina na posição 337, no éxon 4, em homozigose, que ocasiona a troca do aminoácido glicina por arginina.

L 238 R:

Substituição de uma timina por uma guanina na posição 749, no éxon 7, em heterozigose, que ocasiona a troca de leucina por arginina.

R 257 W:

Substituição da citosina por timina na posição 805, no éxon 7, em homozigose, que ocasiona a troca do aminoácido arginina por triptofano.

A 298T:

Mutação neutra, assim nomeada por ser demonstrado previamente que não ocorre alteração na função enzimática (GOODMAN, 1998), como decorrente da

substituição de uma adenina por uma guanina na posição 928, no éxon 8, com a troca do aminoácido alanina por treonina.

G 306 N:

No seqüenciamento do éxon 8, foi observada na paciente 10, a substituição de uma guanina por uma timina na posição 954, que mudaria o aminoácido a ser codificado, de glicina por asparagina.

A 382 T:

Substituição de uma guanina por uma adenina na posição 1180, que altera o aminoácido de alanina para treonina, em homozigose.

G 391 G

Constitui na troca de guanina por timina na posição 1209, neste caso, não ocorre substituição do aminoácido. É considerada uma mutação neutra.

V 400 M:

Substituição de uma guanina por uma adenina na posição 1234, em heterozigose, que ocasiona a troca de valina por metionina.

R 402 W

Substituição de citosina por timina na posição 1240, com a substituição do aminoácido arginina por triptofano.

Tabela 11-Resultados da análise molecular por SSCP, seqüenciamento e espectrometria de massa de ácidos orgânicos de 14 pacientes com suspeita de acidúria glutárica tipo I.

PACIENTE	SERVIÇO	ESPECTROMETRIA	SSCP ALTERADO	MUTAÇÃO/EXON
1-HGL	UNICAMP	Positiva	Éxon 7	G 101 R / G 101 R Éxon 4
2-MOS	UNICAMP	Positiva	Éxon 10	A 382 T / A 382 T Éxon 10
3-AVC	UNICAMP	Positiva	—	V 400 M / L 238 R Éxon 10/ Éxon 7
4-HRS	HC R.P.	Positiva	Éxon 7 e 10	R 402 W / R 402 W G 391 G / G 391 G * Éxon 10
5-ZRS	HC R.P.	Positiva	N/R	Presumido=4
6-RVN	EPM	Negativa	—	—
7-GNR	EPM	Negativa	—	—
8-VMV	EPM	Negativa	Éxon 7	—
9- SSC	EPM	Negativa	—	G 391 G * Éxon 10
10-ACM	EPM	Positiva	Éxon 10 e 7	G 306 N / G 306 N Éxon 8
11- RRD	IC-USP	Positiva	—	R 402 W / R 402 W G 391 G / G 391 G * Éxon 10
12- DSS	IC-USP	Positiva	Éxon 9a, 10	R 402 W / R 402 W G 391 G / G 391 G* Éxon 10
13- ML	IC-USP	Positiva	Éxon 10	R 402 W / R 402 W G 391 G / G 391G * Éxon 10
14-JPMP	IC-USP	Positiva	Éxon 10	R 257 W / R 257 W A 298 T / A 298 T* Éxons 7 e 8

* corresponde às mutações neutras

DISCUSSÃO

A incidência estimada por BJUGSTAD, GOODMAN E FREED (2000), da AG I, é de 1 caso a cada 30.000 nascidos vivos. O fato de termos observado uma alta frequência de consangüinidade pode ser uma indicação de que a frequência gênica para mutações no gene AGCH seja menor em nosso país.

Embora entre nossos pacientes tenha sido observada, uma maior frequência de pacientes do sexo masculino, isso provavelmente se deve ao pequeno número de casos, visto que, sendo uma doença de herança autossômica recessiva a proporção entre os sexos deveria ser igual. Apesar de não ser estatisticamente significativo, esse achado poderia ser explicado pela maior gravidade clínica nos pacientes do sexo masculino, conforme descrita por STRAUSS *et al.*(2003 a e b). Ele observou que os meninos apresentam um diferente padrão de expressão dos receptores D1 e D2 e maior vulnerabilidade estriatal. Teríamos então mais meninas assintomáticas ou oligossintomáticas, que não estariam sendo identificadas. Entretanto, em nossa amostra, apesar de uma das meninas (número 10) apresentar o quadro neurológico mais brando, outra (número 2) já apresentava o quadro mais grave, o mesmo acontecendo com a paciente de número 5, que era irmã de um menino também afetado, e que apresentou um quadro mais grave em relação a ele.

A distribuição de nossos pacientes diferiu em relação ao relatado na literatura, no que se refere à apresentação clínica inicial. Dos 14 pacientes de nossa amostra, em nove o quadro clínico neurológico era de início insidioso. No entanto quando consideramos apenas os pacientes com espectrometria de massa de ácidos orgânicos positiva, metade dos pacientes apresenta a forma insidiosa, o que não diferiu significativamente ($\chi^2 = 3,333$; $P=0,07$) da proporção observada por HOFFMANN *et al.* em 1996, que refere que 75% dos 57 pacientes avaliados retrospectivamente, apresentavam crise encefalopática, e em 25%, o início havia sido insidioso.

Tabela 12- Achados clínicos referentes à forma de início, presença de macrocrania e hiperhidrose em relação à literatura.

	HOFFMANN 1995 21 PACIENTES	KYLLERMAN 1994 12 PACIENTES	NOSSA AMOSTRA 10 PACIENTES
FORMA DE INÍCIO	CRISE	76%	50%
	INSIDIOSA	24%	50%
MACROCRANIA		67%	25%
HIPERHIDROSE		35%	83% (5 DE 6)

A suspeita diagnóstica referente aos quatro pacientes que não apresentavam alteração na espectrometria de massa de ácidos orgânicos foi baseada em alterações clínicas e neuro-radiológicas compatíveis. HAWARTH *et al.* (1991) recomendam que o diagnóstico de AG I deve ser considerado mesmo em pacientes que aparentemente apresentam ECNE (encefalopatia crônica não evolutiva), ou mesmo pacientes assintomáticos com anormalidades de neuro-imagem típicas da doença. KYLLERMAN *et al.* (1994) em publicação referente aos casos diagnosticados na Suécia e Noruega, recomenda que a cromatografia de ácidos orgânicos deva ser realizada repetidas vezes, dada a alta taxa de resultados falso-negativos.

HOFFMANN *et al.* em 1995, resumizou os achados clínicos no curso natural da doença em 21 pacientes, observando a presença de distonia em todos eles. STRAUSS *et al.* em 2003 a, nos 57 pacientes estudados refere que em 74%, foi observado um quadro grave de distonia e em 14%, a distonia era referida como de leve a moderada, e apenas 12% dos pacientes não apresentavam acometimento motor.

Em relação aos nossos pacientes que apresentaram alteração bioquímica e molecular, nove deles apresentavam quadro distônico grave, e 1 deles quadro leve. Sendo que não foi observada distonia nos quatro pacientes que não tiveram a confirmação diagnóstica bioquímica e molecular. (tabela 13)

Tabela 13-Achado de distonia em nossos pacientes em relação à Literatura

AUTOR/ANO	DISTONIA GRAVE	DISTONIA LEVE A MODERADA	SEM DISTONIA
HOFFMANN /1995 21 pacientes		100%	–
STRAUSS /2003 57 pacientes	74%	14%	12%
Nossa amostra 10 pacientes	90%	10%	–

Na análise molecular, detectamos mutações já descritas na literatura, que seriam: G101R no éxon 4, R257W no éxon 7, A298T no éxon 8, e as mutações G391G, R402W, V400M e A382T no éxon 10.

Encontramos duas mutações que não haviam sido relatadas previamente.

No éxon 7, na posição 749, observamos a substituição de uma timina por uma guanina, que resultaria na troca do aminoácido leucina por arginina (L238R). Nesta mesma posição, já foi reportada em 2002, por LIN *et al.* uma mutação que aparecia em heterozigose em dois irmãos com quadro clínico grave. Nesse caso, a substituição foi de uma timina por citosina, que ocasiona a troca do aminoácido leucina por prolina (L238P).

No éxon 8, posição 954, foi observada a substituição de uma guanina por uma timina, que ocasionaria a troca de ácido glutâmico por asparagina na posição 306, sendo nomeada G 306 N.

Por serem inéditas, seu seqüenciamento foi repetido nos dois sentidos, e confirmada a alteração em ambos. No entanto, para se demonstrar se ela teria efeito deletério, seriam necessários estudos funcionais.

Entre mutações descritas, a de maior prevalência identificada foi a R402W, que consiste na troca do nucleotídeo citosina da posição 1240, por uma timina, ocasionando a substituição do aminoácido arginina por triptofano. Essa mutação é responsável por 20% dos alelos mutantes na Europa, conforme publicação de GOODMAN *et al* (1998). Em

2000, ZSCHOCKE *et al.* puderam observar que essa mesma mutação seria responsável por 40% dos alelos nos pacientes de origem alemã.

Na avaliação molecular de 30 pacientes de origem espanhola, realizada por BUSQUETS *et al* 2000 a, a prevalência da mutação R402W foi de 28%, sendo encontrada uma mutação ainda mais prevalente, a A293T no éxon 8 em 30% dos alelos. Essa mutação não foi encontrada em nossa casuística.

BUSQUETS *et al.* publicou em 2000 b, a análise molecular de sete pacientes portugueses e seis italianos, cinco deles de publicações prévias (SCHWARTZ *et al.* 1998, e ZSCHOCKE *et al.* 2000). Nesse estudo, a mutação mais prevalente observada foi a R402W, em 11 de 26 alelos, o que corresponde a 42%. Em nosso estudo, 10 de 20 alelos (50%) apresentaram essa mutação. (tabela 14)

Tabela 14-Incidência da mutação R402W na nossa amostra e em publicações prévias.

AUTOR / ANO	POPULAÇÃO ESTUDADA	PORCENTAGEM ENCONTRADA
GOODMAN <i>et al.</i> 1998 5 publicações prévias	Européia	20%
ZSCHOCKE <i>et al.</i> 2000 48 pacientes	Alemã	40%
BUSQUETS <i>et al.</i> 2000a 30 pacientes	Espanhola	28%
BUSQUETS <i>et al.</i> 2000b 13 pacientes	Portuguesa / Italiana	42%
Nossa amostra 10 pacientes	Brasileira	50%

BUSQUETS *et al.* em 2000a, correlacionou achados bioquímicos e moleculares, observando que pacientes com algumas mutações (V400M, R227P, E365K), mesmo em heterozigose composta, apresentavam uma excreção urinária particularmente alta de glutarato e 3 hidroxiglutarato. Nosso paciente de número 3, heterozigoto para a

mutação V400M, apresentou quadro bioquímico compatível com o descrito por BUSQUETS, confirmando suas observações.

Os pacientes 6, 7, 8 e 9, nos quais não foram identificadas mutações patogênicas na análise molecular realizada no gene GCDH, podem ainda apresentar uma mutação intrônica, não identificável pelo método utilizado. No entanto, correspondem aos pacientes, nos quais, os exames de espectrometria de massa de ácidos orgânicos foram negativos para a AG I, apesar de apresentarem quadro clínico e/ou neuro-radiológico compatíveis. Com isso é pouco provável que esses pacientes tenham o diagnóstico de AG I, nos levando a refletir se não haveria um outro diagnóstico não identificado nesses casos.

Em sua publicação 2000, na qual ZSCHOCKE *et al.* apresentaram o método que foi presentemente utilizado em nosso trabalho, com a técnica de SSCP seguida por sequenciamento. Ele observou 100% de sensibilidade em seus 48 pacientes com diagnóstico confirmado pela análise enzimática, ou seja, em todos os pacientes foi encontrada mutação em ambos os alelos. Sua casuística foi composta também por pacientes com suspeita clínica de AGI, e estudo enzimático negativo, e nesses pacientes não foi detectada alteração molecular.

Em nossa amostra, entre os pacientes que apresentavam espectrometria de massa de ácidos orgânicos positiva, a técnica de SSCP realizada inicialmente mostrou-se capaz de triar o éxon mutado em apenas quatro pacientes (40%), pacientes 2, 4, 12, 13, sendo observado resultado falso positivo nos pacientes 1, 8, 10 e 14.

Não pudemos observar neste estudo uma correlação genótipo-fenótipo pela casuística em número restrito. No entanto, mesmo em grandes estudos, envolvendo um maior número de pacientes, essa correlação não foi encontrada.

Em nosso trabalho, pudemos observar a grande diferença entre o quadro clínico dos irmãos 4 e 5, que presumimos, teriam as mesmas mutações (a mutação neutra G391G em homozigose, associada à mutação R402W também em homozigose). Diversas publicações enfatizam a variabilidade clínica em irmãos, por presumir que teriam a mesma alteração genotípica. Desde 1977, quando GREGERSEN *et al.* publicou o relato de caso de dois irmãos, com quadro clínico discordante. Diversos outros autores vêm observando essa heterogeneidade e reportando seus achados (AMIR *et al.* 1987, MORTON *et al.* 1991,

ANIKSTER *et al.* 1996, RENNER *et al.*1997). BUSQUETS *et al.* em 2000a, observou um par de irmãos, em que um deles falecera aos 2 anos por complicações da doença, enquanto o outro permanecia assintomático.

Esses resultados demonstram que, a heterogeneidade clínica e molecular da acidúria glutárica tipo I, já descrita em publicações envolvendo populações européias, também é observada na população brasileira.

CONCLUSÕES

1. A presença de distonia é o principal sinal clínico da acidúria glutárica tipo I;
2. A suspeita clínica é fundamental para o início da propedêutica diagnóstica;
3. A suspeita clínica sem alterações bioquímicas ou moleculares indica menor probabilidade da doença, devendo-se continuar a investigação diagnóstica para outras causas;
4. O método de SSCP foi capaz de triar o éxon mutado em apenas 40% dos pacientes;
5. Nossos resultados indicam que o seqüenciamento seria um método de análise imprescindível para o diagnóstico molecular;
6. A mutação R402W, ocorreu em nossa amostra em 50 % dos alelos mutantes;
7. A distribuição das mutações em nossa amostra sugere que, para um estudo molecular da acidúria glutárica tipo I na população brasileira, deve-se iniciar com a análise do éxon 10.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Estratégias de diagnóstico
 - Campanhas informativas
 - Folhetos e palestras
 - Programas de triagem
 - Reforçam a própria necessidade da triagem pela estimativa de incidência em nossa população
2. Espectrometria de massa em tandem
3. Busca ativa de casos
 - Em ambulatórios de neurologia
 - Em fichas de notificação compulsória de reação vacinal

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- AL-ESSA,M. *et al.* (1998) Fluoro-2-deoxyglucose (FDG) PET scan of the brain in glutaric aciduria type I: clinical and MRI correlations. **Brain Dev**, 20:295-301.
- AMIR,N.; EI-PELEG, O.; SHALEV,R.; CHRISTENSEN,E.: Glutaric acidúria type I: Clinical heterogeneity and neuroradiologic features. **Neurology**, 37:1654-1657, 1987.
- BAHR,O.; MADER,I.; ZSCHOCKE.; DICHGANS,J.; SCHULZ,J.B.: Adult onsetglutaric aciduria type I presenting with a leukoencephalopathy. **Neurology** 59:1802-1804, 2002.
- BARÍC,J.; ZSCHOCKE,J.; CHRISTESEN,E.; DURAN,M.; GOODMAN,S.I.; LEONARD,J. *et al.* Diagnosis and management of glutaric acidúria type I. **J. Inher. Metab. Dis.**21 326-340,1998.
- BENNET,MJ.; MARLOW,N.; POLLITT,R.; WALES,J.: Glutaric aciduria type I: Biochemical investigations and postmortem findings. **Eur J Pediatr**, 145:403, 1986.
- BERGMAN,I.; FINEGOLD.; GARTNER,J.; ZITELLI,B.; CLAASEN,D.; GOODMAN,S.I. *et al.*: Acute profound dystonia in infants with glutaric acidemia. **Pediatrics**, 83:228-234, 1989.
- BIERY,B.J.; STEIN,D.; MORTON,D.; GOODMAN,S.: Gene Structure and Mutations of Glutaryl-Coenzyme A Dehydrogenase: Impaired Association of Enzyme Subunits That Is Due to an A421V Substitution Causes Glutaric Acidemia Type I in the Amish. **Am.J.Hum.Genet.**, 59:1006-1011, 1996.
- BJUGSTAD,K.B.; GOODMAN,S.; FREED,C.R.: Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric academia type I. **J pediatr**, 137:681-686, 2000.
- BRANDT,N.J.; BRANDT,S.; CHRISTENSEN,E.; GREGERSEN,N.; RASMUSSEN,K.: Glutaric aciduria in progressive choreo-athetosis. **Clinical Genetics**, 13: 77-80, 1978.
- BUSQUETS,C.; MERINERO,B.; CHRISTENSEN,E. *et al.*: Glutaryl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Spain. Evidence on two Groups of Patients, Genetically and Biochemically Distinct. **Pediatric Research**, 48:315-322, 2000a.
- BUSQUETS,C.; SORIANO,M. ALMEIDA,I.; GARAVAGLIA,B.; RIMOLDI,M.; RIVERA,I. *et al.*: Mutation Analysis of the GCDH Gene in Italian and Portuguese Patients with Glutaric Aciduria Type I. **Molecular Genetics and Metabolism** 71,535-537, 2000b.

CHOW,C.W.; HAAN,E.; GOODMAN,S.I.; ANDERSON,R.; EVANS,W.; KLEINSCHMIDT-DeMASTERS,B.; WISE,G.; McGILL,J.; DANKS,D.: Neuropathology in glutaric academia type I. Acta **Neuropathol (Berl)**,76:590-594, 1988.

CHRISTENSEN,E.: prenatal diagnosis of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency: experience using first-trimester chorionic villus sampling. **Prenatal Diag.** 14:333-336, 1994.

DUNGER,D.; SNODGRASS,G.: Glutaric aciduria type I presenting with hypoglycaemia. **J Inherit Metab Dis**, 7:122, 1984.

FLOTT-RAHMEL,B.; FALTER,C.; SCHLUFF,P.; FINGERHUT,R.; CHRISTENSEN,E.; JAKOBS,C. et al.: Nerve cell lesions caused by 3-hydroxyglutaric acid: a possible mechanism for neurodegeneration in glutaric acidemia I. **J Inherit Metab Dis**, 20:387-390, 1997.

GOODMAN,S.I.; MARKEY,S.; MOE, P.; MILES,B.; TENG,C.: Glutaric aciduria: a new disorder of amino acid metabolism. **Biochem Med** 12:12-21, 1975.

GOODMAN,S.I.; NORENBURG,M.; SHIKES,R.; BRESLICH,D.; MOE,P.: Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations. **J Pediat** , 90:746-750, 1977.

GOODMAN,S.I.; STEIN,D.; SCHLESINGER,S.; CHRISTENSEN,E.; SCHWARTZ,M.; GREENBERG,C.; ELPELEG,O.: Glutaryl-CoA Dehydrogenase Mutations in Glutaric Acidemia (type): Review and Report of Thirty Novel Mutations. **Human mutation**, 12:141-144, 1998.

GOODMAN et FRERMAN (1997) In Scriver. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease** CD-ROM Chapter 42: Organic Acidemias due to Defects in Lysine Oxidation: 2-ketoadipic Acidemia and Glutaric Acidemia.

GREENBERG,C.R.: Outcome of the First 3-Years of a DNA-Based Neonatal Screening Program for Glutaric Acidemia Type I in Manitoba and Northwestern Ontario,Canada. **Molecular Genetics and Metabolism**, 75,70-78, 2002.

GREENBERG,C.R.; DUNCAN,A.; GREGORY,C.; SINGAL,R.; GOODMAN,S.I.: Assignment of human glutaryl-CoA dehydrogenase gene(GCDH) to the short arm of chromosome 19(19p13.2) by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. **Genomics**, 21:289-290, 1994.

GREGERSEN,N.; BRANDT, N.J.; CHRISTENSEN,E.; GRON,I.; RASMUSSEN,K.; BRANDT,S.: Glutaric acidúria: Clinical and laboratory findings in two brothers. **The Journal of PEDIATRICS**. 90;5:740-745, 1977.

HAWARTH,J.C.; BOOTH,F.; CHUDLEY,A.; deGROOT,G.; DILLING,L.; GOODMAN,S.I.; GREENBERG,C.R.; *et al*: Phenotypic variability in glutaric aciduria type I: Report of fourteen cases in five Canadian Indian kindreds. **J pediatr**, 118:52, 1991.

HOFFMANN,G.F.; ATHANASSOPOULOS,A.; BURLINA,A.; DURAN,M.; KLERK,J.; LEHNERT,W. *et al*: Clinical course, early diagnosis, treatment and prevention of disease in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **Neuropediatrics**, 27:115-123, 1996.

HOFFMANN,G.F.; TREFZ,F.; BARTH,P.; BOHLES,H-J.; BIGGEMANN,B.; BREMER,H. *et al*: Glutaryl-CoA Desidrogenase Deficiency: A Distinct Encephalopathy. **Pediatrics**, vol 88: No 6, December1194-1203, 1991a.

HOFFMANN,G.F.; TREFZ,F.; BARTH,P.; BOHLES,H-J.; LEHNERT,W.; CHRISTENSEN,E. *et al*: Macrocephaly: an important indication for organic acid analysis. **J Inherit Metab Dis**, 14:329-332, 1991b.

HOFFMANN,G.F.; GIBSON,K.; TRFZ,F.K.; NYHAN,W.; BREMER,H.; RATING,D.: Neurological manifestations of organic acid disorders. **Eur J Pediatr**, 153 [Suppl 1]:S94-S100, 1994a.

HOFFMANN,G.F.: Selective screening for inborn errors of metabolism-past, present and future. **Eur J Pediatr**, 153[Suppl 1]:S2-S8, 1994b.

HOFFMANN,G.F.; BOHLES,H.; BURLINA,A.; DURAN,M.; HERWIG,J.; LEHNERT,W. *et al*: Early signs and course of disease of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **J.Inher.Metab.Dis**,18 173-176, 1995.

KOHLSCHÜTTER,A.: Neuroradiological and neurophysiological indices for neurometabolic disorders. **Eur J Pediatr**, 153 [Suppl 1]:S90-S93, 1994.

KYLLERMAN,O.H.; SKJELDAL,O.;LUNDBERG,M.; HOLME,I.; JELLUM,E.; von DOBELN,U. ET AL.: Dystonia and Dyskinesia in Glutaric Aciduria Type I: Clinical Heterogeneity and Therapeutic Considerations. **Movement Disorders**, Vol 9, no 1,pp 22-30, 1994.

LEHNERT,W. *et al.*(1994) Long-term results of selective Screening for inborn errors of metabolism. **Eur J Pediatr**, 153 [Suppl 1]:S9-S13.

LEIBEL,RL.; SHIH,V.; GOODMAN,S.; BAUMAN,M.; McCABE,E.; ZWERDLING,R. *et al.*: Glutaric Acidemia: A metabolic disorder causing progressive choreoathetosis. **Neurology**, 30:1163, 1980.

LIN,S.K.; HSU,S.; HO,E.; TSAI,C.; HSEIH,Y.; LO,F.; LAI,H.; CHEN,M.: Novel mutation and prenatal sonographic findings of glutaric acidúria (type I) in two Taiwanese families. **Prenat. Diag.** 22(8):725-729, 2002

LYON,G.; ADAMS,R.D.; KOLODNY,E.H. The neurology of Neonatal Hereditary Metabolic Diseases. Em **Neurology of Neonatal Hereditary Metabolic Diseases of Children**, Ed Mc Graw-Hill, 2^a edição 1996 pp 6-41.

MANDEL,H.; BRAUN,J.; EL-PELEG,O.; CHISTENSEN,E.; BERANT,M.: Glutaric aciduria type I- Brain CT features and a diagnostic pitf,all. **Neuroradiology**, 33:75-78, 1991.

MERINERO,B.; PEREZ-CERDA,C.; FONT,L.; GARCIA,M.; APARICO,M.; LORENZO,G.; *et al.*: Variable clinical and biochemical presentation of seven Spanish cases with glutaryl-CoA-dehydrogenase deficiency. **Neuropediatrics**, 26:238-242, 1995.

MORTON,D.H.; BENNET,M.; SEARGEANT,L.; NICHTER,C.; KELLEY,R.: Glutaric acidúria type I: A common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in Amish of Lancaster County, Pennsylvania. **Am J Med Genet**, 41:89, 1991.

MÜHLHAUSEN,C.; CHRISTENSEN,E.; SCHWART,M. MUSCHOL,N.; ULRICH,K.; e LUKACS,Z.: Severe phenotype despite high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity: A novel mutation in a Turkish patient with glutaric acidúria type I. **J. Inherit Metab. Dis** 26:713-714,2003.

ORITA,M; SUZUKI,Y.; SEKIYA,T.; HAYASHI,K.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. **Genomics**, 5:874 -9, 1989.

RENNER,C. *et al.* (1997) Clinically asymptomatic glutaric aciduria type I in a 4 5/12-year-old girl with bilateral temporal arachnoid cysts. **J Inherit Metab Dis**, 20:840-841.

SAIKI,R.K. *et al.*(1988) - Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491.

SCHWARTZ,M.; CHRISTENSEN,E.; SUPERTI-FURGA,A.; BRANDT,N.; The human glutaryl-CoA dehydrogenase gene: Report of intronic sequence and of 13 novel mutations causing glutaric aciduria type I. **Hum Genet** 102:452-458, 1998.

SOFFER,D. *et al.*(1992) Striatal degeneration and spongy myelinopathy in glutaric academia. **J Neurol Sci**, 107:199-204.

STRAUSS,K.; PUFFENBERGER,E.; ROBINSON,D.; MORTON,D.: Type I Glutaric Aciduria, Part 1: Natural History of 77 Patients. **Am J Med Genet**, (Semin Med Genet) 121C:38-52, 2003a.

STRAUSS,K., MORTON,D.: Type I Glutaric Aciduria, Part 2: A model of acute striatal necrosis. **Am J Med Genet**, (Semin Med Genet) 121C:53-70, 2003b.

STUTCHFIELD,P. EDWARDS,M.; GRAY,R.; CRAWLEY,P.; GREEN,A.: Glutaric Aciduria Type I Misdiagnosed as Leigh's Encephalopathy and Cerebral Palsy. **Developmental Medicine & Child Neurology**, 27,514-521, 1995.

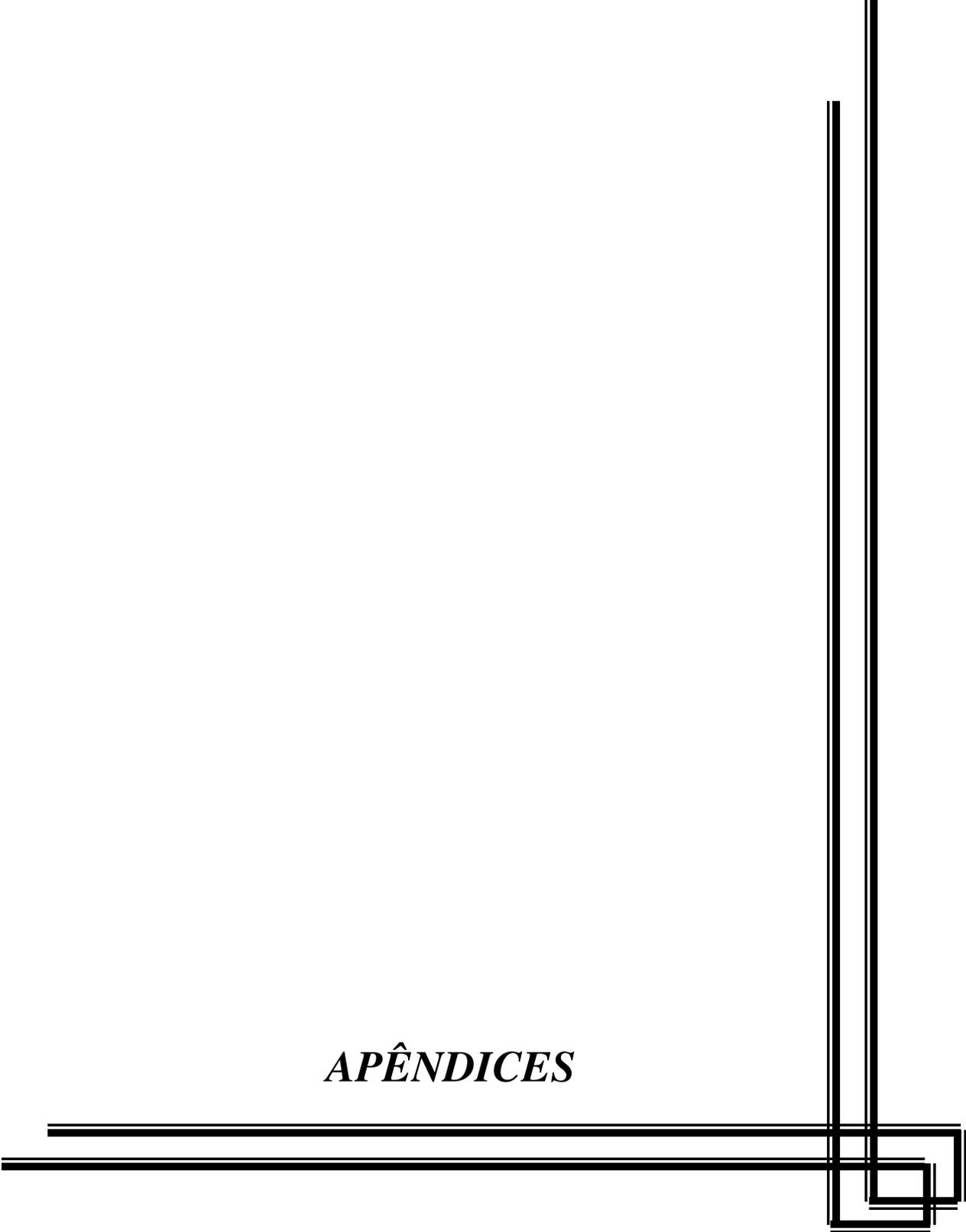
SUPERTI-FURGA,A *et al.*(1997) Glutaric aciduria type I (glutaryl-CoA-dehydrogenase deficiency): Advances and unanswered questions. Report from an international meeting. **Eur J Pediatr**, 156:821-828.

SUPERTI-FURGA,A *et al.*(2003) Glutaric aciduria type I and neonatal screening: time to proceed-with caution. **Eur J Pediatr** ,162:S17-S20.

WILSON,G.N.: Introduction of Semin Med Genet: Preventive Medicine for Genetic Disorders. **Am J Med Genet**, 89:55-57, 1999.

ZSCHOCKE,J.; QUAK,E.; GULDBERG,P.; HOFFMANN,G.: Mutation analysis in glutaric aciduria type I. **J Med Genet** 37:177-181,2000.

APÊNDICES



APÊNDICE I



Universidade Estadual de Campinas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: ACIDÚRIA GLUTÁRICA TIPO I, AVALIAÇÃO CLÍNICA E ESTUDO MOLECULAR DOS CASOS BRASILEIROS.

Responsáveis: Daniela Faroro Giovannetti, Denise Yvonne Janovitz Norato e Carmem Silvia Bertuzzo- fone (19) 3788-8904

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado(a) a participar em um projeto de pesquisa envolvendo portadores e familiares de indivíduos com acidúria glutárica tipo I. A acidúria glutárica tipo I é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da enzima glutaril-CoA desidrogenase. Seu curso clínico típico caracteriza-se pelo início entre 6 e 18 meses de vida através de quadro distônico tetraparético em graus variados após episódio de stress agudo (infeccioso ou não), ou mesmo de início incidioso desde os primeiros meses de vida.

O objetivo geral do estudo é estudar essa alteração ao nível dos sintomas (clínico) e do DNA (molecular). O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que, se concordar em participar desse estudo, deverei responder a perguntas a respeito dos antecedentes médicos e familiares de meu filho. Uma amostra de sangue venoso será colhida (8 ml, o equivalente a uma colher de sopa) de meu filho, para se realizar o estudo molecular, no intuito de se identificar se há e qual é a mutação responsável pela doença. Hospitalização não será necessária.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 8 ml (o equivalente a uma colher de sopa) de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a participação de meu filho nesse estudo, a não ser um diagnóstico mais preciso, e a possibilidade posterior de identificação precoce da doença em familiares de risco. Para avaliação dos familiares em risco, deve-se entrar em contato no telefone abaixo. Fui informado que logo que for

detectada alguma alteração gênica, serei comunicado, sendo que todas as conseqüências serão devidamente explicadas. Em todos os indivíduos que forem detectadas alterações gênicas, será oferecida toda a orientação genética. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (019) 3788-8904 (Dra. Daniela).

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado. Me foi garantido ainda que o DNA extraído do sangue do meu filho não será utilizado em protocolos e/ou pesquisas de natureza diversa à do proposto neste termo de consentimento.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 3788-8936.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar, ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue), sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____ explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e Rg participante

Assinatura do participante

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

APÊNDICE II

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA - ACIDÚRIA GLUTÁRICA TIPO I

IDENTIFICAÇÃO:

Nome:

Filiação:

Data de nascimento:

Instituição:

Registro na Instituição:

Médico Responsável:

HISTÓRIA CLÍNICA:

Consangüinidade parental sim não
Se sim, qual o grau? _____

Recorrência familiar sim não
Se sim, qual o parentesco e nome do paciente _____

Intercorrências gestacionais e/ou de parto _____

Desenvolvimento neuropsicomotor
inicial _____

Características da doença:

1. crise encefalopática sim não

2. insidioso com distonia e ADNPM sim não

Idade (em meses) na época da crise encefalopática _____

Idade (em meses) ao diagnóstico _____

Achados clínicos:

- | | | | | |
|-------------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|
| 1. Discinesia | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 2. Distonia | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 3. Hipotonia | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 4. Tetraplegia | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 5. Macrocefalia ao nascimento | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 6. Macrocefalia na infância | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 7. Suor excessivo | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 8. Crises hiperpiréxicas | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |

Exames subsidiários:

- Cromatografia de ácidos orgânicos sim não

Metabólitos encontrados _____

- Dosagem enzimática sim não

Resultado _____

Achados neuro-radiológicos:

- | | | | | |
|----------------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|
| 1. Atrofia fronto-temporal | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 2. Alteração de gânglios da base | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |

Data do início do tratamento e medicações usadas: ___/___/___

- | | | | | |
|-----------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|
| 1. Carnitina | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 2. Riboflavina | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 3. Inibidores do GABA | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |
| 4. Dieta especial | sim | <input type="checkbox"/> | não | <input type="checkbox"/> |

Foi observada melhora com início do tratamento sim não

Se sim, breve descrição da melhora apresentada _____

Coleta de DNA do paciente: sim não

Se não, qual o motivo?

APÊNDICE III-CORRELAÇÃO DOS PACIENTES E SEUS NÚMEROS DE REGISTRO NO LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DA UNICAMP.

PACIENTE	REGISTRO
1-HGL	543/02
2-MOS	1865/03
3-AVDC	1250/03
4-HRS	1698/03
5-ZRS	—
6-RVN	1687/03
7-GNR	1692/03
8-VMMV	1691/03
9- SSC	1690/03
10-ACVEM	1689/03
11- RRD	189/04
12- DSS	187/04
13- ML	188/04
14-JPMP	190/04