

Causas metabólicas de rabdomiólise associadas a mutações no gene *LPIN1*

Metabolic causes of rhabdomyolysis associated with LPIN1 mutations

Célia Nogueira, Diana Nunes, Altina Lopes, Laura Vilarinho

celia.nogueira@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

A rabdomiólise resulta da lise do músculo-esquelético, devido à lesão no tecido muscular com consequente libertação de componentes intracelulares do músculo para a corrente sanguínea, originando mioglobínúria e, nos casos mais graves, falência renal aguda. As causas mais frequentes de rabdomiólise são o consumo de álcool, drogas, exercício físico intenso, compressão muscular traumática e infeções. As miopatias metabólicas são causas de rabdomiólise e decorrem da incapacidade em produzir a quantidade de ATP adequada às necessidades das células musculares, por deficiência de enzimas do metabolismo dos glícidos, lípidos ou nucleósidos. Normalmente surgem na infância, sob a forma de fraqueza muscular e mioglobínúria recorrentes após exposição a estímulos que em condições normais não causam necrose muscular, como é o caso do exercício físico ligeiro, infeções virais ou jejum prolongado. Estas doenças são normalmente causadas por defeitos na β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, no entanto alterações no metabolismo da Lipina constituem a segunda causa mais comum de rabdomiólise com início precoce. Esta deficiência é autossómica recessiva e está associada a mutações no gene *LPIN1*. Neste sentido foi implementado este estudo genético na nossa Unidade, o que permitiu a identificação do primeiro doente português com uma nova mutação no gene *LPIN1*. Este estudo contribuiu para esclarecer a causa da doença nesta família, expandir o espectro mutacional deste gene, assim como oferecer um aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal às famílias afetadas. Os nossos dados corroboram assim a importância do estudo molecular do gene *LPIN1* para confirmar doentes (crianças e adultos) com rabdomiólise recorrente. A caracterização molecular destes doentes é importante uma vez que existe a possibilidade de um tratamento adequado.

_Abstract

Rhabdomyolysis results from damage in skeletal muscle fibres and release of intracellular components of the muscle to the bloodstream, which leads to myoglobinuria, and in severe cases, acute renal failure. The most frequent causes of rhabdomyolysis are alcohol and other drugs consumption, excessive physical activity, trauma and infections. As metabolic myopathies are causes of rhabdomyolysis and result from the inability to produce an adequate amount of ATP for muscle needs, due to enzymatic deficiencies in carbohydrates, lipids or nucleosides metabolism. Usually occur in childhood and are expressed by pain, muscle weakness and myoglobinuria after physical exercise, viral infections or fasting, which under normal conditions do not cause muscle necrosis. These diseases are frequently caused by defects in mitochondrial fatty acids β -oxidation, however defects in lipin metabolism represent the second most common cause of rhabdomyolysis with

early onset. This disease is autosomal recessive and is associated with LPIN1 mutations. This genetic study was implemented in our Unit and allowed the identification of the first Portuguese patient with a novel mutation in LPIN1 gene, which contributes to clarify the cause of the disease in this family, to expand the mutational spectrum of this gene and will be important for an accurate genetic counseling. Our data corroborate the importance of the molecular study of the LPIN1 gene to confirm recurrent rhabdomyolysis in children and adults. The molecular characterization of these patients is important as there is a possibility of an adequate treatment.

_Introdução e objetivo

A rabdomiólise (RM) é uma síndrome clínico-laboratorial que resulta da lise das células musculares esqueléticas causando mioglobínúria e evoluindo em alguns casos para insuficiência renal (1). A RM está associada a várias causas, nomeadamente: compressão muscular traumática, exercício físico intenso, consumo de álcool, aumento da temperatura corporal, hipoperfusão muscular, causas tóxicas e farmacológicas, alterações eletrolíticas e endócrinas, infeções e causas hereditárias (2). As causas de RM podem assim dividir-se em traumáticas (adquiridas) e não-traumáticas (hereditárias) (tabela 1), ocorrendo estas últimas cinco vezes mais que as traumáticas (1). Independentemente da causa esta patologia segue uma via comum, quer por lesão direta das fibras do músculo-esquelético (causa adquirida), quer por deficiência na produção de energia (causas hereditárias), levando ambas à necrose das fibras musculares (3). Assim, os principais sintomas de RM são: mialgia, fraqueza muscular, mioglobínúria e falência renal.

Na ausência de tratamento esta doença pode causar morte por disfunção renal, cardíaca e hematológica (5). O tratamento consiste essencialmente em administrar por meio intravenoso, após os primeiros sintomas, uma solução

Tabela 1: ⬇️ Causas de rabdomiólise (RM), adaptado de (4).

<p>Traumáticas Adquiridas</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Drogas/Toxinas ■ Abuso de álcool ■ Infecção/Sepsis ■ Esforço físico extremo ■ Lesão por esmagamento ■ Isquémia ■ Perturbação metabólica ■ Doenças neurológicas primárias ■ Idiopática ■ Hipertermia maligna ■ Distrofias musculares ■ Canalopatias musculares ■ Síndrome de infusão de propafol
<p>Não-Traumáticas Hereditárias</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Alterações no metabolismo dos ácidos gordos (deficiência de: VLCAD, CPTI, CPTII) ■ Alterações no metabolismo do glicogénio - Glicogenoses (tipo V, VII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV) ■ Doenças mitocondriais ■ Doenças na bomba de cálcio (gene <i>RYR1</i>) ■ Distrofias musculares e miopatias ■ Doenças do metabolismo da lipina (gene <i>LPIN1</i>)

altamente concentrada de glucose (6), seguida de hidratação intravenosa com a administração de soro fisiológico (1,5L/h) (2) e por fim, alcalinização da urina para minimizar a precipitação de mioglobina nos rins (7). Assim, o diagnóstico e a terapêutica precoce da RM são fundamentais para evitar a progressão da doença (2).

Doenças do metabolismo da Lipina

As miopatias metabólicas são consideradas causas raras de RM que se encontram normalmente associadas a defeitos na β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, no entanto, alterações no metabolismo da lipina, constituem a segunda causa mais comum de RM com início precoce (3,4,8). Esta deficiência é autossómica recessiva e está associada a mutações no gene *LPIN1*. Este gene foi identificado pela primeira vez em 2008 por Zeharia *et al.* (9), associado a RM grave e recorrente, desencadeada por febre, exercício, anestésicos e jejum prolongado. As mutações no gene *LPIN1* originam deficiências do metabolismo energético e são responsáveis por mais de 50% dos epi-

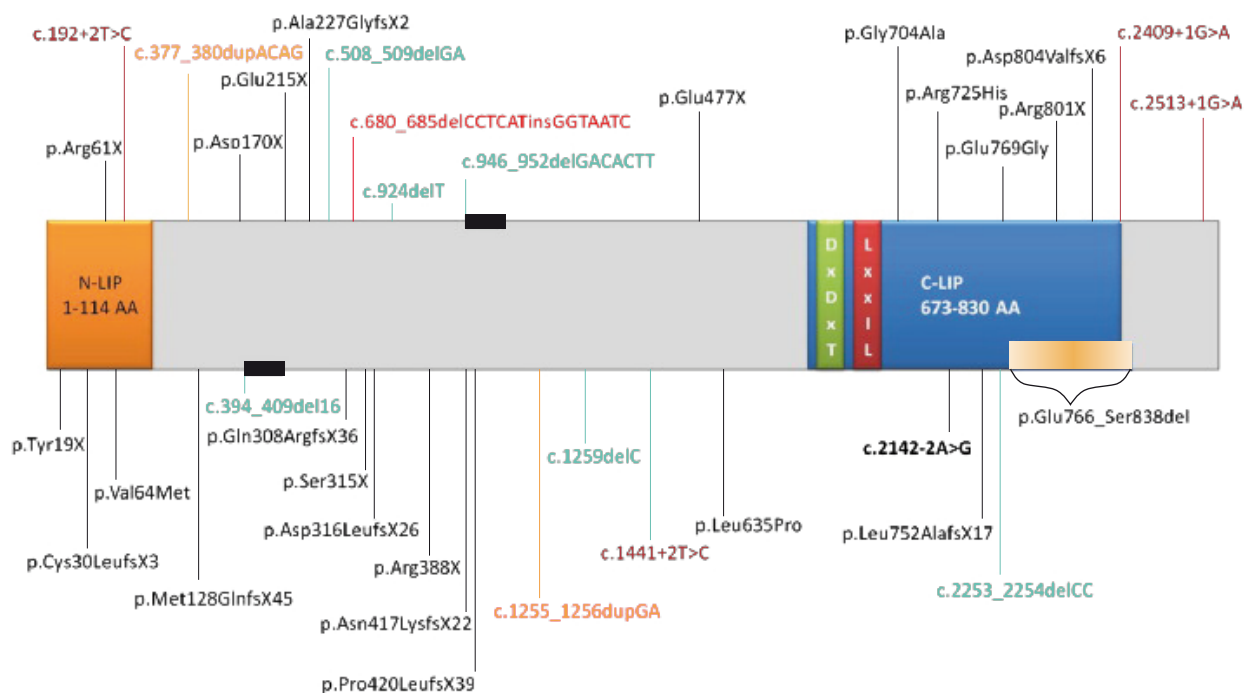
sódios de RM em doentes pediátricos com idade inferior aos 6 anos e com níveis de CK elevados (>10.000 U/L) (6), no entanto as mutações em heterozigotia estão associadas a doentes adultos (10) que podem apresentar como sintomas, câimbras e mialgia provocadas pelo exercício (8).

O gene *LPIN1* possui 5363 pb, distribuídos por 20 exões, dos quais 19 são transcritos. Este gene localiza-se no cromossoma 2p25.1 e codifica a proteína lipin-1.

Segundo a revisão da literatura (10) e a base de dados profissional *The Human Gene Mutation Database* (HGMD) estão descritas 36 mutações, 22 *missense/nonsense*, 4 mutações de *splicing*, 6 pequenas deleções, 2 inserções, 1 deleção/inserção e 1 grande deleção. Esta última funciona como *hotspot* mutacional e está localizada entre os exões 17 e 19: c.2295-866_2410-30del1763 (11).

Na figura 1 estão representadas todas as mutações descritas até ao momento neste gene.

Figura 1: Mutações descritas no gene *LPIN1*, adaptado de (10) e HGMD® profissional.



_Objetivo

Este trabalho tem como objetivo apresentar os resultados do estudo molecular do gene *LPIN1* em doentes portugueses com sintomatologia de RM, suspeitos de alterações no metabolismo da lipina.

_Doentes e métodos

Foram estudados 20 doentes provenientes de hospitais de todo o país, sendo na maioria crianças. Os principais sintomas clínicos apresentados foram fraqueza muscular, mialgias e RM recorrente. Estes doentes foram previamente excluídos para doenças da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos, pelo que se procedeu ao estudo molecular do gene *LPIN1*. Este estudo foi efetuado por sequenciação direta de fragmentos amplificados por PCR, a partir de DNA genómico extraído de sangue. Todos os exões do gene *LPIN1*, e respetivas regiões intrónicas flanqueadoras, foram sequenciados por procedimentos já descritos. Foi também pesquisada, através da técnica de *Long-range* PCR, uma grande deleção descrita neste gene (11).

_Resultados e discussão

Após a investigação molecular dos 20 doentes selecionados, identificou-se uma nova mutação de *splicing* (c.2142-2A>G) não descrita na literatura, até este estudo (12), que segundo previsões bioinformáticas (13) quebra o local aceitador de *splicing*. Esta mutação foi identificada numa doente em heterozigotia, associada a sintomas de RM com mialgia, fraqueza muscular, fadiga e apneia do sono. No entanto, a filha desta doente aos 2 anos começou a desenvolver uma clínica grave de RM com crises recorrentes e níveis de CK elevados. Esta criança faleceu aos 4 anos devido a uma crise de RM causada por uma gastroenterite, ficando a sua causa de morte por esclarecer. Como existia DNA disponível, foi pesquisada a mutação encontrada na mãe, tendo esta sido identificada em homozigotia. Sendo, por este motivo, provavelmente patogénica e causadora de doença (12).

Outras variantes foram também identificadas em heterozigotia neste estudo, tais como: p.S286del, p.V494M e p.P610S. Estas variantes podem ser consideradas provavelmente patogénicas, segundo alguns recursos bioinformáticos utiliza-

dos (13-16). A variante p.S286del apenas altera o *splicing* da proteína, enquanto que as variantes p.P610S e p.V494M, para além da alteração de aminoácido, causam alterações na conformação da estrutura da proteína e alteram o *splicing* proteico. No entanto, outros estudos serão necessários para clarificar a patogenicidade destas variantes.

Conclusão

As mutações no gene *LPIN1* têm sido associadas à segunda causa mais comum de RM de início precoce, uma causa não reconhecida há dez anos atrás. Embora se trate de uma doença autossómica recessiva as mutações patogénicas em heterozigotia neste gene podem ser a causa de formas mais leves de RM em doentes adultos, devido à importância desta proteína (lipin-1) em diversas vias metabólicas.

Este estudo, para além de ser o primeiro estudo molecular do gene *LPIN1* associado à RM realizado em doentes portugueses, também contribuiu para esclarecer o diagnóstico molecular definitivo numa família com apresentações clínicas distintas e associadas a uma nova mutação de *splicing* (c.2142-2A>G). O estudo deste gene contribuiu também para expandir o seu espetro mutacional, assim como oferecer um aconselhamento genético e um diagnóstico pré-natal às famílias de risco. Os nossos dados corroboram assim a importância do estudo molecular do gene *LPIN1* para investigar doentes (crianças e adultos) com RM recorrente, uma vez que existe a possibilidade de um tratamento adequado.

Referências bibliográficas:

- (1) Bagley WH, Yang H, Shah KH. Rhabdomyolysis. Intern Emerg Med. 2007;2(3):210-8.
- (2) Rosa NG, Silva G, Teixeira A, et al. Rabdomiólise. Acta Méd Port. 2005;18(4): 271-81 www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1032/700
- (3) Hamel Y, Mamoune A, Mauvais FX, et al. J Inherit Metab Dis. 2015;38(4):621-8. Review.
- (4) Scalco RS, Gardiner AR, Pitceathly RD, et al. Orphanet J Rare Dis. 2015;10:51. Review. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4522153/
- (5) Schweitzer GG, Collier SL, Chen Z, et al. Rhabdomyolysis-Associated Mutations in Human *LPIN1* Lead to Loss of Phosphatidic Acid Phosphohydrolase Activity. JIMD Rep. 2015;23:113-22. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4484911/
- (6) Pichler K, Scholl-Buergi S, Birnbacher R, et al. A novel therapeutic approach for *LPIN1* mutation-associated rhabdomyolysis--The Austrian experience. Muscle Nerve. 2015;52(3):437-9.
- (7) Antons KA, Williams CD, Baker SK, et al. Clinical perspectives of statin-induced rhabdomyolysis. Am J Med. 2006;119(5):400-9. Review.
- (8) Meijer IA, Sasarman F, Maftei C. *LPIN1* deficiency with severe recurrent rhabdomyolysis and persistent elevation of creatine kinase levels due to chromosome 2 maternal isodisomy. Mol. Genet. Metab. Rep. 2015;5:85-8.
- (9) Zeharia A, Shaag A, Houtkooper RH, et al. Mutations in *LPIN1* cause recurrent acute myoglobinuria in childhood. Am J Hum Genet. 2008;83(4):489-94. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2561931/
- (10) Michot C, Hubert L, Romero NB, et al. Study of *LPIN1*, *LPIN2* and *LPIN3* in rhabdomyolysis and exercise-induced myalgia. J Inherit Metab Dis. 2012;35(6):1119-28.
- (11) Michot C, Hubert L, Brivet M, et al. *LPIN1* gene mutations: a major cause of severe rhabdomyolysis in early childhood. Hum Mutat. 2010;31(7):E1564-73.
- (12) Nunes D, Nogueira C, Lopes A, et al. *LPIN1* deficiency: a novel mutation associated with different phenotypes in the same family. Mol Genet Metab Rep. 2016;9:29-30. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5050266/
- (13) Human Splicing Finder. www.umd.be/HSF3/
- (14) Mutation Taster www.mutationtaster.org
- (15) Polyphen-2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- (16) Sift <http://sift.jcvi.org/sift-bin/>

Artigo adaptado de: Nunes D, Nogueira C, Lopes A, Chaves P, Rodrigues E, Cardoso T, Leão Teles E, Vilarinho L. *LPIN1* deficiency: a novel mutation associated with different phenotypes in the same family. Mol Genet Metab Rep. 2016 Oct 2;9:29-30. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5050266/