

Defeitos da β -Oxidação Mitocondrial: Um Caso Fatal de Deficiência em 3-Hidroxi-Acil-CoA Desidrogenase de Cadeia Longa. (LCHAD)

H. FLORES ⁽¹⁾, C. COSTA ⁽²⁾, C. VASCONCELOS ⁽²⁾, D. BARATA ⁽¹⁾, A. MARQUES ⁽¹⁾, M. SANTOS LEITE ⁽²⁾, I. TAVARES DE ALMEIDA ⁽²⁾

⁽¹⁾ Unidade de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) – Hospital Dona Estefânia (HDE);

⁽²⁾ Centro de Metabolismos e Genética (CMG) – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL).

Resumo

Descreve-se um caso fatal de deficiência em 3-hidroxi-ácil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHAD) diagnosticado numa criança de 8 meses de idade, segunda filha de um casal jovem, saudável e consanguíneo. Os primeiros sintomas manifestaram-se aos 6,5 meses de idade ao entrar em coma hipoglicémico não cetótico do qual recupera após infusão i.v. de glucose. Detectou-se hepatomegália e posteriormente cardiomegália. A presença de acidúria 3-hidroxi-dicarboxílica foi confirmada após teste de jejum prolongado de 13th e o estudo enzimático efectuado em cultura de fibroblastos de biópsia de pele confirmou o défice em LCHAD.

Palavras-chave: β -oxidação mitocondrial; oxidação dos ácidos gordos; 3-hidroxi-ácil-CoA desidrogenase; erros hereditários do metabolismo; hipoglicémia não cetótica.

Summary

We report a new fatal case of long-chain 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase deficiency diagnosis in a 8 months old female child, second daughter of an young healthy and consanguineous couple. The first signs were detected at the age of 6,5 months when she developed non ketotic hypoglycemia coma with recovery after i.v. glucose infusion. Hepatomegaly and later cardiomegaly were detected. After a 13th fasting test 3-hydroxydicarboxylic aciduria was confirmed and enzymatic studies in cultured skin fibroblasts showed a deficiency of LCHAD.

Key-words: mitochondrial β -oxidation diseases; fatty acids oxidation; 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase; inborn errors of metabolism; hypoketotic hypoglycemia.

Introdução

Os defeitos da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos constituem uma patologia de reconhecimento recente e crescente. São causa importante de doença dado a gravidade dos sintomas associados e a frequência relativamente elevada na globalidade das doenças metabólicas. A maioria destes defeitos manifesta-se durante os primeiros meses de vida através de episódios recorrentes de hipoglicémia não cetótica de causa não evidente. A rápida e inexplicável evolução da sintomatologia tem levado a que erradamente os doentes sejam rotulados com o diagnóstico de síndrome de Reye, sepsis ou morte súbita e inexplicável do lactente ⁽¹⁾.

Até a data foram descritas e devidamente documentadas catorze alterações distintas que afectam a β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos ^(2, 3, 4). Desde a descrição do primeiro caso ^(3, 4), em 1990, de deficiência em 3-hidroxi-ácil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHAD) (McKusick 143450) cerca de quarenta novos casos foram reconhecidos. As manifestações clínicas descritas ⁽⁵⁾ incluem: episódios recorrentes de hipoglicémia não cetótica, hipotonia, miopatia, disfunção hepática severa e cardiomiopatia. Na maioria dos casos verificou-se a presença de acidúria 3-hidroxi-dicarboxílica sem cetonúria.

Descreve-se um novo caso de deficiência em LCHAD, comprovado através dos estudos enzimáticos efectuados em fibroblastos de biópsia de pele, de uma criança com 8 meses de idade que faleceu com insuficiência cardíaca refractária.

Caso clínico

L.B., sexo feminino, raça Caucasiana, 2.^a filha de pais jovens e consanguíneos (primos em 2.^o grau). História familiar de falecimentos de recém-nascidos e lactentes; irmã de 3 anos saudável. Nasceu após gravidez de termo, vigiada e sem intercorrências. Parto eutócito, hospitalar. Peso à nascença de 2850g. Sem problemas no período neonatal.

A criança foi aparentemente saudável até aos 6,5 meses de idade com desenvolvimento psico-motor e estatura-ponderal adequados. Nesta altura, deu entrada, num hospital distrital, em coma hipoglicémico não cetótico (glicémia = 2mg/dl), do qual recuperou rapidamente com a administração i.v. de glucose. O exame objectivo revelou hepatomegália. A mãe refere a ocorrência de episódios de vômitos que não valorizou. É colocada a hipótese diagnóstica de alteração da β -oxidação dos ácidos gordos. Contudo, os estudos metabólicos efectuados não revelaram alterações, excepto um ligeiro aumento da lactacidémia (4.30mM). Teve alta com indicação de fraccionar as refeições; no entanto, repetem-se, no intervalo de 1 mês, dois internamentos por episódios semelhantes.

Aos 8 meses foi internada na UCIP do HDE por paragem respiratória e bradicárdia. Foi ventilada mecanicamente suporte de que veio a necessitar durante todo o internamento. Na observação de entrada, salientava-se hipotonia generalizada e hepatomegália (4cm abaixo do rebordo costal direito, ultrapassando a linha média, de consistência firme). A auscultação cardio-pulmonar era normal. A radiografia do tórax revelou cardiomegália. O estudo ecocardiográfico mostrou hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo com hipocontractilidade sugestiva de miocardiopatia hipertrófica. Os exames laboratoriais de rotina revelaram: anemia, aumento das aminotransferases, hiperamoniémia e ligeira acidose metabólica. A glicémia estava normal na altura do internamento. A ecografia transfontanelar era normal e o electroencefalograma tinha um traçado difusamente lento e ligeiramente deprimido.

Mantendo-se a suspeita de alteração da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos no decorrer do internamento realizaram-se exames complementares. O estudo anátomo patológico de fígado revelou esteatose macrovacuolar grave com fibrose pericelular ligeira e, o de músculo, foi inespecífico. Paralelamente, em função dos estudos bioquímicos a serem realizados efectuaram-se novas colheitas de material biológico devidamente programadas. A carnitina plasmática total (= livre + acil-carnitina de cadeia curta) estava baixa 31.6 μ mol/L (V.N. = 47.6 ± 7.7) e estudos posteriores revelaram a presença de acil-carnitinas de cadeia longa. A análise dos

ácidos orgânicos urinários efectuada em urina colhida após teste provocativo de jejum prolongado de 13th revelou a presença de acidúria 3-hidroxi-dicarboxílica compatível com a deficiência em LCHAD. Durante a prova de jejum, realizada sob controlo, verificou-se uma descida significativa da glicémia e ausência de cetonúria. O estudo enzimático em fibroblastos de biópsia de pele confirmou a deficiente actividade da 3-hidroxi-acyl-CoA desidrogenase de cadeia longa.

A doente foi inicialmente alimentada com leite adaptado e nutrição, com teor mínimo de aporte de glucose (9mg/Kg/min) a fim de prevenir a hipoglicémia. Posteriormente, introduziram-se na dieta suplementos de carnitina e de triglicéridos de cadeia média, os quais não influenciaram a evolução clínica. Apesar das medidas dietéticas e de suporte (ventilação mecânica, inotrópicos, vasodilatadores, diuréticos) a criança faleceu em insuficiência cardíaca refractária ao 54.^o dia de internamento.

Material e Métodos

Oa ácidos orgânicos urinários e plasmáticos, após extracção por acetato de etilo, foram analisados na forma de derivados tri-metil-silil (TMS) por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS), de acordo com M. Duran et al.⁽⁶⁾. A carnitina total (= livre + acil-carnitina de cadeia curta), após hidrólise alcalina do ultrafiltrado, foi analisada por um método colorimétrico usando o ácido di-tio-bis-(nitrobenzóico). As acilcarnitinas de cadeia longa plasmáticas foram analisadas, após extracção em fase sólida, na forma de acil-oxi-lactonas, por GC-MS com diluição isotópica e ionização química⁽⁷⁾. Os ácidos 3-hidroxi- e mono-carboxílicos foram analisados, após extracção e formação dos derivados apropriados, por GC-MS com monitorização iónica selectiva (SIM), de acordo com C. Costa (manuscrito em preparação).

Os ensaios de β -oxidação global e enzimáticos foram efectuados em cultura de fibroblastos de biópsia de pele, usando diversos substratos. (R. Wanders, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Holanda).

Os exames laboratoriais de base foram realizados, segundo as técnicas de rotina do laboratório do HDE.

Resultados

A análise dos ácidos orgânicos urinários efectuada numa amostra de urina colhida após 13h de jejum revelou a presença de acidúria dicarboxílica compatível com a deficiência em LCHAD⁽⁸⁾: ausência de ácido 3-hidroxi-butírico e acetoacético e a excreção de quantidades significativas dos ácidos 3-hidroxi-dicarboxílicos (C_6 - C_{12}) e dicarboxílicos (C_6 - C_{10}) (Quadro I). Alterações metabóli-

cas que se revelaram de forma atenuada nas amostras colhidas durante os episódios de hipoglicémia e ausentes nos períodos assintomáticos. A análise dos ácidos monocarboxílicos efectuada numa amostra de plasma referente a uma colheita de sangue efectuada após crise de hipoglicémia demonstrou a presença dos ácidos 3-hidroxi-monocarboxílicos (C_8 - C_{16}) (Quadro II), os quais são na sua quase totalidade retidos na corrente sanguínea devido à polaridade que a sua estrutura química lhe confere⁽⁹⁾. Perfis metabólicos semelhantes foram descritos por Duran et al.⁽⁸⁾ em casos de deficiência em LCHAD. A concentração da carnitina total plasmática (= livre + acil-carnitina de cadeia curta) determinada numa amostra colhida na fase inicial do internamento estava baixa: 31.6 μ mol/L (V.N. = 47.6 \pm 7.7). Contudo, foram detectadas diversas

acil-carnitinas de cadeia longa: 3-hidroxi-acil (C_{16} - C_{18}) saturadas e insaturadas (Quadro III). Dados que reconfirmaram a acumulação dos ácidos 3-hidroxi-monocarboxílicos provenientes do bloqueio ao nível da LCHAD⁽¹⁰⁾. Subsequentemente foi iniciada a terapêutica com carnitina na tentativa de incrementar a excreção dos metabolitos eventualmente tóxicos. A capacidade de oxidação global foi testada utilizando-se os fibroblastos em cultura do doente na presença de dois substratos com cadeia carbonada de diferentes comprimentos (C_{10} e C_{16}) (Quadro IV) tendo-se detectado uma oxidação anómala do ácido palmítico (C_{16}). A deficiente actividade da LCHAD foi confirmada pelos estudos enzimáticos efectuados em homogeneizado de fibroblastos na presença de dois substratos distintos (Quadro V).

QUADRO I

Ácidos orgânicos urinários detectados após prova prolongada de jejum (13 h).

5 - Hidroxi-hexanóico	Sebácico (insat. + sat.)
Adípico	3 - Hidroxi-sebácico (insat. + sat.)
3 - Hidroxi-adípico	3 - Hidroxi dodecanóico I e II
Lactona 3 - hidroxi-adípico	3 - Hidroxi-dodecanodióico
Subérico (insat. + sat.)	
3 - Hidroxi-subérico (insat. + sat.)	

insat.: insaturado; sat.: saturado.

QUADRO II

Ácidos 3 - hidroxi - mono - carboxílicos plasmáticos detectados numa amostra colhida em crise hipoglicémia

Composto	Concentração (μ M)	
	Amostra	Controlos
3 - Hidroxi-octanóico (3-OHC ₈)	1.27	Vestigial
3 - Hidroxi-decanóico (3-OHC ₁₀)	1.18	Vestigial
3 - Hidroxi-dodecanóico (3-OHC ₁₂)	0.99	Vestigial
3 - Hidroxi-tetradecanóico (3-OHC ₁₄)	0.73	Vestigial
3 - Hidroxi-hexadecanóico (3-OHC ₁₆)	2.24	Vestigial

QUADRO III

Acil - carnitinas de cadeia longa detectadas no plasma.

Acil-carnitina	Doente	Controlo
3 - Hidroxi - hexadecanoil - carn. (3-OH-C ₁₆)	Presente	N.D.
3 - Hidroxi - hexadecanoil - carn. (3-OH-C _{16:1})	"	"
Octadecanoil - carn. (C ₁₈)	"	"
Octadecenoil - carn. (C _{18:1})	"	"
3 - Hidroxi - Octadecanoil - carn. (3-OHC ₁₈)	"	"
3 - Hidroxi - Octadecenoil - carn. (3-OHC _{18:1})	"	"

N.D. - não detectado.

QUADRO IV

Actividade global da β -oxidação* (nmol / h.mg proteína) em cultura de fibroblastos de biópsia de pele.

Substrato	Mirístico (C ₁₀)	Palmitico (C ₁₆)	C ₁₆ / C ₁₀
Doente	4.90	3.70	0.76
Controlo	5.41 \pm 2.05 (n=42)	9.04 \pm 2.87 (n=14)	0.66 \pm 0.22

* (R. wanders, Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands).

QUADRO V

Actividade enzimática de 3-hidroxi-amil-CoA desidrogenase* (nmol / min.mg proteína) em cultura de fibroblastos de biópsia de pele.

Substrato	Doente	Controlo
Acetoacetil - CoA (C ₄)	69.6	98 \pm 31 (n=75)
3 - Ceto - hexadecanóil - CoA (C ₁₆)	19.3	84 \pm 22 (n=72)
3 - Ceto - hexadecanóil - CoA/ Acetoacetil - CoA	0.28	0.88 \pm 0.21 (n=72)

* (R. Wanders, Academic Medical Center, University of Amsterdam, The Netherlands).

Discussão

As alterações metabólicas associadas a β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos levam à diminuição da pool de radicais acetil-CoA e conseqüentemente à produção deficitária de corpos cetónicos provocando desequilíbrio na homeostase energética. Crises de hipoglicémia não cetótica foram observadas na maioria dos casos descritos⁽⁸⁾. Em regra, os primeiros sinais de alerta manifestaram-se entre o 5º e o 9º mês de vida⁽¹¹⁾. Crises recorrentes são típicas nestas patologias associadas, a maioria das vezes, a períodos de jejum superiores a 7h (relacionados com o aumento do intervalo das refeições nocturnas), infecções respiratórias ou gastrointestinais e a episódios de vômitos⁽⁵⁾. O primeiro episódio de hipoglicémia não cetótica na nossa doente surgiu aos 6 1/2 meses de idade de acordo com a forma clássica de apresentação. A instituição de dieta fraccionada não evitou a repetição das crises.

Até à data, todos os defeitos da β -oxidação intramitocondrial foram associadas à presença de acidúria dicarboxílica⁽⁸⁾. Perfil metabólico que não permite a efectivação do diagnóstico diferencial mas que conjuntamente com outros dados bioquímicos e clínicos é sugestivo de alteração na oxidação dos ácidos gordos⁽¹²⁾. A presença de acidúria 3-hidroxi-dicarboxílica tem sido associada à deficiência em 3-hidroxi-amil-CoA desidrogenase. Contudo, formas atenuadas de acidúria 3-hidroxi-dicarboxílica têm sido descritas em doentes portadores de outros déficits da oxidação dos ácidos gordos ou de do-

ença com envolvimento hepático, em situações de cetoadicose e ainda nas primeiras semanas de vida em recém-nascidos normais⁽¹²⁾. Os estudos bioquímicos efectuados na nossa doente, em material biológico colhido no 1.º internamento, revelaram uma acidúria dicarboxílica e 3-hidroxi-dicarboxílica moderada não específica e hiperlactidémia. Os defeitos do metabolismo da glucose e do glicogénio foram considerados mas os estudos efectuados não revelaram alterações. A detecção de acidose láctica tem sido referida em alguns casos⁽¹³⁾, não sendo contudo um dado típico dos defeitos da β -oxidação. O mecanismo envolvido não é ainda conhecido, todavia estudos recentes indicam que os intermediários da oxidação dos ácidos gordos que se acumulam nos déficits das acil-CoA desidrogenases de cadeia longa inibem o sistema da fosforilação oxidativa o que pode explicar a inibição da oxidação do piruvato nestes doentes^(13, 14, 15). O exame objectivo revelou hepatomegália e a biópsia de fígado fibrose ligeira e esteatose macrovacuolar e detectou-se posteriormente a presença de cardiomegália. Sintomatologia que parece ser frequente nos casos de deficiência em LCHAD, de acordo com a literatura⁽¹⁶⁾. A prova de jejum de 13h induziu o aparecimento de hipoglicémia e de acidúria 3-hidroxi-dicarboxílica caracterizada por uma excreção de ácidos 3-hidroxi-dicarboxílicos (C₁₀ e C₁₂) superior à dos dicarboxílicos não substituídos⁽¹⁷⁾. Tal como na nossa doente foi detectada a diminuição do teor de carnitina total plasmática em diversos casos^(5, 8). Paralelamente demonstrámos a presença no plasma de 3-hidroxi-acilcarnitinas (C₁₆ e C₁₈) de cadeia longa assim como a

dos ácidos 3-hidroxi-monocarboxílicos (C_8 - C_{16}) em amostras colhidas nas crises de hipoglicemia. Estes metabolitos intermediários foram reconhecidos como tendo valor de diagnóstico nos déficits em LCHAD⁽¹⁸⁾. Os estudos bioquímicos efectuados conjuntamente com os dados clínicos permitiram-nos dirigir o diagnóstico no sentido da deficiência em LCHAD a qual foi posteriormente confirmada pelos estudos enzimáticos.

A deficiência em LCHAD, entre os defeitos da β -oxidação, parece ser aquele que apresenta o prognóstico mais reservado no que respeita à sobrevivência e resposta ao tratamento (dieta pobre em gorduras e com suplemento de triglicéridos de cadeia média). A nossa doente, tal como outros casos descritos, faleceu com insuficiência cardíaca refractária apesar da instituição das medidas dietéticas preconizadas e usadas com sucesso em alguns casos. A eficácia da terapêutica provavelmente depende do estado do doente. Deste modo, a suspeita de alteração da oxidação dos ácidos gordos deve ser colocada sempre que se observam distúrbios na homeostase energética. Sinais menores tais como vômitos e diarreia com prostração devem ser valorizáveis. Dada a intermitência observada nestas patologias, quer dos sinais clínicos, quer bioquímicos, é da maior importância a recolha dos produtos biológicos nos períodos de crise.

BIBLIOGRAFIA

1. Turnbull DM, Shepherd IM, Aynsley-Green A. Inherited defects of mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochem Soc Trans* 1988; 16: -7.
2. Nyhan WL. Abnormalities of fatty acid oxidation. *N Engl J Med* 1988; 318: 1344-6.
3. Hale D E, Thorpe C, Braat K, Wright J H, Roc CR, Coates P M, Hashimoto T, Glasgow A M. The L-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase deficiency. In: Tanaka K, Coates PM (eds) Fatty acid oxidation: Clinical, biochemical and molecular aspects. AR Liss, New York, 1990; 503-10.
4. Wanders R J A, Ijlst L, Gennip A H van, Jakobs C, Jager J P de, Dorland L, Sprang F J van, Duran M. Long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency- Identification of a new inborn error of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inher Metab Dis* 1990; 13: 311-4.
5. Przyrembel H, Jakobs C, Ijlst L, de Klerk J B C, Wanders R J A. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 674-80.
6. Duran M, Ketting D, van Vossen R, Beckering T E, Dorland L, Bruinvis L, Wadman S K. Octanoylglucuronide excretion in patients with a defective oxidation of medium-chain fatty acids. *Clin Chim Acta* 1985; 152: 253-60.
7. Costa C G, Struys E A, Bootsma A, H ten Brink, Dorland L, Tavares de Almeida I, Duran M and Jakobs J. Quantitative profiling of plasma acylcarnitines using gas chromatography chemical ionization mass fragmentography. *In press J Lipid Res*.
8. Duran M, Wanders R J A, de Joger J P, Dorland L, Bruinvis L, Ketting D, Ijlst, van Sprong F J. 3-hydroxydicarboxylic aciduria due to long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency associated with sudden neonatal death: protective effect of medium-chain triglyceride treatment. *Eur J Pediatr* 1991; 150: 190-5.
9. Dorland L, Ketting D, Bruinvis L, Duran M. Medium and long-chain 3-hydroxydicarboxylic acids: analysis by gas chromatography combined with mass spectrometry. *Biomedical Chromat* 1991; 8: 161-4.
10. Pollitt R J, Losty H, Westwood A. 3-hydroxydicarboxylic aciduria. A distinctive type of intermittent dicarboxylic aciduria of possible diagnostic significance. *J Inher Metab Dis* 1987, 2 suppl 10: 266-9.
11. Jakobs S, Kler R S, Bartlett K, Pourfarzam M, Aynsley-Green A, Bindoff L A, Turnbull D M. Combined defect of long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, 2-enoyl-CoA hydratase and 3-oxoacyl-CoA thiolase. In: Tanaka K, Coates P M (eds). New developments of fatty acid oxidation, Wiley-Liss, Inc. 1992; 327-37.
12. Moore R, Glasgow J F T, Bingham M A, Dodge J A, Ollitt R J, Olpin S E, Middleton B, Carpenter K. Long-chain 3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase deficiency-diagnosis, plasma carnitine fractions and management in a further patient. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 433-6.
13. Jackson S, Bartlett K, Land J, Moxon R, Pollitt R J, Leonard J V, Turnbull D M. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Ped Res* 1991, 29 (4): 406-11.
14. Ventura F V, Ruiten J P N, Ijlst L, T Almeida I, Wanders R J A. Inhibition of oxidative phosphorylation by palmitoyl-CoA digitonin permeabilized fibroblasts: implications for long-chain fatty acid β -oxidation disorders. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1272: 14-20.
15. Ventura F V, Ruiten J P N, Ijlst L, Tavares de Almeida I, Wanders R J A. Inhibitory effect of 3-hydroxyacyl-CoA and other long-chain fatty acid β -oxidation intermediates on mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 161-4.
16. Pollitt R J. Clinical and biochemical presentation in 20 cases of hydroxydicarboxylic aciduria. In Tanaka and Coates P M (eds). Fatty acid oxidation. Alan R Liss, New York 1990; 495-502.
17. Hagenfeldt L von Döbeln, Holme E, Alm, I, Brondberg G, Enocksson E, Lindberg L. 3-hydroxyacyl-CoA aciduria - a fatty acid oxidation defect with severe prognosis. *J Pediatr* 1990; 116: 387-92.
18. Coates P M, Tanaka K. Molecular basis of mitochondrial fatty acid defects. *J Lipid Res* 1992; 33: 1099-110.

Correspondência: I. Tavares de Almeida
Centro de Metabolismos e Genética
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
Av. das Forças Armadas
1600 Lisboa