

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**MORTE SÚBITA INESPERADA NA INFÂNCIA: ESTIMATIVA DA
PREVALÊNCIA MÍNIMA DA ACIDEMIA METILMALÔNICA TIPO MUT⁰,
CITRULINEMIA TIPO I E DEFICIÊNCIA DE DESIDROGENASE DE 3-HIDRÓXI-
ACIL-COA DE CADEIA LONGA EM UMA AMOSTRA DE INDIVÍDUOS HÍGIDOS
DO RIO GRANDE DO SUL**

Dévora Natalia Randon

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Co-orientadora: Dra. Fernanda Sperb Ludwig

Porto Alegre, agosto de 2019

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences do centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob o registro n° 17-0249.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Ida Schwartz, pela orientação, o apoio e o constante acompanhamento. Obrigada por acreditar em mim, por tantos ensinamentos e oportunidades; por me estimular a dar sempre o melhor de mim.

À Dra. Fernanda Sperb-Ludwig, pela orientação e todo o apoio. Obrigada por me ajudar a crescer. Tu és para mim um exemplo.

À Dra. Fernanda Bitencourt, pela amizade, a generosidade, tanto trabalho e dedicação. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão.

À UFRGS e ao PPGBM por garantirem um ensino de excelência. Em Especial ao Sr. Elmo Cardoso, por estar sempre à disposição.

À todos os colegas do BRAIN, pelo companheirismo, o apoio e a amizade. Rafael Tresbach, Juliana Verch, Alexia Sant'Ana, Júlia Deimling, Vaneisse Monteiro, Mariana Lopes e Camila Matuella: vocês foram uma parte crucial da minha jornada, estarei sempre agradecida.

À toda minha querida família, em especial aos meus pais, tudo o que eu sou, eu devo a vocês. Obrigada pelo carinho, o apoio e as forças na distância.

Aos meus amigos, por todo o carinho apesar da ausência.

Ao meu namorado, pelo apoio e o carinho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	Morte súbita inesperada na infância.....	13
1.2.	Erros inatos do metabolismo	14
1.2.1.	Erros inatos do metabolismo: Classificação	15
1.2.2.	Erros inatos do metabolismo: Sintomatologia	16
1.2.3.	Erros inatos do metabolismo associados à morte súbita inesperada na infância.....	17
1.3.	Acidemia metilmalônica tipo mut0 (AMMmut ⁰)	21
1.3.1.	Fisiopatologia	21
1.3.2.	Manifestações clínicas	23
1.3.3.	Aspectos moleculares	23
1.3.4.	Diagnóstico.....	24
1.3.5.	Tratamento	25
1.4.	Citrulinemia tipo I (CTLNI).....	25
1.4.1.	Fisiopatologia	26
1.4.2.	Manifestações clínicas.....	27
1.4.3.	Aspectos moleculares	28
1.4.4.	Diagnóstico.....	30
1.4.5.	Tratamento	30
1.5.	Deficiência de desidrogenase de 3-hidróxi-acil-CoA de cadeia longa (LCHADD)	30
1.5.1.	Fisiopatologia	31
1.5.2.	Manifestações clínicas	33
1.5.3.	Aspectos moleculares	34
1.5.4.	Diagnóstico.....	35

1.5.5.	Tratamento	36
1.6.	Triagem neonatal	36
1.6.1.	Triagem neonatal no Brasil.....	37
2	JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVOS.....	41
3.1.	Objetivo geral	41
3.2.	Objetivos específicos.....	41
4	ARTIGO.....	43
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	69
7	REFERÊNCIAS	71
	Anexo I Ficha de coleta de dados	85
	Anexo II Carta de aprovação do projeto	86
	Anexo III Comprovante de submissão do artigo	87
8	APÊNDICES.....	89
8.1.	Genetic diagnosis and genotype-phenotype association in 113 Brazilian individuals with reduced biotinidase activity.	89
8.2.	Diagnóstico genético e associação genótipo-fenótipo de 35 indivíduos brasileiros com atividade reduzida de biotinidase.	90
8.3.	Erros inatos do metabolismo associados à morte súbita: investigação da frequência da variante patogênica c.199T>C no gene ACADM em indivíduos saudáveis do Rio Grande do Sul.....	91
8.4.	Diagnóstico genético e associação genótipo-fenótipo de 30 indivíduos brasileiros com atividade reduzida de biotinidase.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ABraOM: Arquivo Brasileiro Online de Mutações

AdoCbl: Adenosilcobalamina

AG: Ácidos graxos

AMM: Acidemia metilmalônica

AMMmut⁰: Acidemia metilmalônica tipo mut⁰

ARGI: Arginase

ASL: Argininosuccinato liase

ASS: Argininosuccinato sintetase

ATP: Adenosina trifosfato

CFSI: Carbamílfosfato sintetase

CoA: Coenzima A

CTLNI: Citrulinemia tipo I

EIM: Erros inatos do metabolismo

EUA: Estados Unidos da América

ExAC: “Exome Aggregation Consortium”

FAOD: “Fatty acid beta-oxidation disorder”

GAI: Acidemia glutárica tipo I

gnomAD: “The Genome Aggregation Database”

GSDIa: Glicogenose tipo Ia

GSDIb: glicogenose tipo Ib

GSDII glicogenose tipo II

KAT: 3-cetoacil-CoA tiolase

Kb: Kilobases

kDa: Kilodaltons

LCAD: Acil-CoA desidrogenase de cadeia longa

LCEH: 2,3-enoil-CoA hidratase de cadeia longa

LCHAD: Desidrogenase de 3-hidróxi-acil-CoA de cadeia longa

LCHADD: Deficiência de desidrogenase de 3-hidróxi-acil-CoA de cadeia longa

LKAT: 3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia longa

MCAD: acil-CoA desidrogenase de cadeia média

MCADD: deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média

MCR: Metilmalonil-CoA epimerase

MKAT: 3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia média

MS/MS: Espectrometria de massas em *tandem*

MTP: Proteína trifuncional mitocondrial

MUT: Metilmalonil-CoA mutase

NAGS: N-acetilglutamato sintetase

NO: Óxido nítrico

OTC: Ornitina carbamiltransferase

Pb: Pares de bases

PCC: Propionil-CoA carboxilase

PNTN: Programa Nacional de Triagem Neonatal

RS: Rio Grande do Sul

SCAD: Acil-CoA desidrogenase de cadeia curta

SCEH: 2,3-enoil-CoA hidratase de cadeia curta

SCHAD: 3-hidróxi-acilCoA de cadeia curta

SIDS: "Sudden infant death syndrome"

SKAT: 3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia curta

SMSL: Síndrome de morte súbita do lactente

SNC: Sistema nervoso central

SUDI: "Sudden unexpected death in infancy"

SUS: Sistema Único de Saúde

VLCAD: Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa

VLCADD: Deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da via do Propionato..	22
Figura 2. Representação esquemática da localização das variantes associadas à acidemia metilmalônica mut ⁰ no gene <i>MUT</i> ..	24
Figura 3. Representação esquemática do ciclo da ureia.....	26
Figura 4. Representação esquemática da localização das variantes associadas à citrulinemia tipo I no gene <i>ASS1</i> ..	29
Figura 5. Representação esquemática da espiral de beta-oxidação dos ácidos graxos.	32
Figura 6. Representação esquemática da localização das variantes associadas à deficiência de 3-hidróxi-acil-CoA de cadeia longa no gene <i>HADHA</i> ..	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Erros inatos do metabolismo associados à SUDI.	18
Tabela 2. Variantes patogênicas de maior prevalência para genes causadores de EIM associados à SUDI.	20

RESUMO

Introdução: A acidemia metilmalônica tipo mut⁰ (AMM mut⁰), a citrulinemia tipo I (CTLNI) e a deficiência de desidrogenase de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia longa (LCHADD) são erros inatos do metabolismo (EIM) associados à morte súbita inesperada na infância (SUDI). Destacam-se por serem passíveis de tratamento e identificáveis por triagem neonatal. As principais variantes patogênicas associadas a estas condições são: c.655A>T e c.1106G>A (AMMmut⁰ - gene *MUT*), 1168G>A (CTLNI - gene *ASS1*) e c.1528G>C (LCHADD - gene *HADHA*). Esses distúrbios não estão incluídos no Programa Nacional de Triagem Neonatal brasileiro, e não existem estimativas referentes à incidência dos mesmos no país. Estudos populacionais de prevalência são de fundamental importância para a consideração do estabelecimento de ações de triagem neonatal, diagnóstico precoce e aconselhamento genético. **Objetivo principal:** Determinar, em uma amostra da população saudável do Rio Grande do Sul (RS), a prevalência mínima da AMM mut⁰, CTLNI e LCHADD. **Metodologia:** Estudo transversal, com amostragem por conveniência. O tamanho amostral foi estimado em 980 indivíduos com base na proporção de heterozigotos para a variante c.1528G>C em diferentes populações europeias. Foram incluídos 1.000 indivíduos saudáveis (média de idade: 36,6±12,1; masculino: 504), recrutados entre os doadores do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS. A genotipagem foi realizada por PCR em tempo real. O cálculo da frequência alélica e genotípica foi feito com base no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. **Resultados:** A variante c.1528G>C foi detectada em heterozigose em 2 indivíduos (frequência de heterozigotos= 1:500; frequência alélica= 0,001; prevalência mínima estimada de LCHADD= 1: 1.000.000 indivíduos). As variantes c.1168G>A, c.655A>T e c.1106G>A não foram encontradas. **Discussão/Conclusões:** Os dados resultantes estariam refletindo a raridade deste conjunto de EIM no RS. No entanto, fatores como o tamanho amostral e a heterogeneidade alélica associada a esses distúrbios devem ser considerados. A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, e este estudo salienta, de maneira inédita, a necessidade de expandir a investigação de EIM em relação à morbimortalidade infantil no território.

ABSTRACT

Introduction: Methylmalonic acidemia type mut0 (mut0 MMA), citrullinemia type I (CTLNI), and long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD) are inborn errors of metabolism (EIM) associated with sudden unexpected death in infancy (SUDI), noteworthy for being treatable and detectable by neonatal screening. The major pathogenic variants associated with these conditions are c.655A>T and c.1106G>A (MMA - gene MUT), c.1168G>A (CTLNI - gene ASS1) and c.1528G>C (LCHADD - gene HADHA). These disorders are not included in the Brazilian neonatal screening program and there is no estimation of its prevalence in the country. Studies of prevalence are essential to early diagnosis, treatment and neonatal screening considerations. **Main objective:** To determine, in a sample of the healthy population of Rio Grande do Sul (RS), the minimum prevalence of mut⁰ MMA, CTLNI and LCHADD. **Methodology:** Cross-sectional study, with convenience sampling. The sample size was estimated at 980 individuals, based on the proportion of heterozygotes for c.1528G>C in different European populations. A total of 1,000 healthy individuals (mean age: 36.6 ± 12.1, male: 504), recruited among donors from the Hospital de Clínicas of Porto Alegre Blood Bank, RS were included. Genotyping was performed through real-time PCR. Allele and genotype frequencies were calculated based on Hardy-Weinberg Equilibrium. **Results:** The c.1528G>C variant was detected in heterozygosity in 2 subjects (carrier frequency = 1: 500, allele frequency = 0.001, LCHADD minimum estimated prevalence = 1: 1,000,000 individuals). Variants c.1168G>A, c.655A>T and c.1106G>A were not found. **Discussion/Conclusions:** The resulting data is thought to denote the rarity of these conditions in the state of RS. Nevertheless, the current sample size as well as the allelic heterogeneity related to these genes should be considered. Brazil is one of the most heterogeneous populations in the world and this study highlights, in an unprecedented way, the need to expand IEM investigation in relation to infant morbidity and mortality within the territory.

CAPÍTULO I INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1. Morte súbita inesperada na infância

A morte súbita inesperada na infância (“Sudden unexpected death in infancy” - SUDI) é definida como a morte de um infante que ocorre de forma súbita e inesperada, até o primeiro ano de idade. Representa uma das mais frequentes causas de óbito após o período neonatal (Moon et al., 2007), sendo responsável por cerca de 4.600 mortes infantis por ano nos Estados Unidos da América (EUA) (Shapiro-Mendoza, 2007). SUDI é uma categoria heterogênea que inclui tanto os casos de óbito cuja causa pode ser determinada após um meticuloso exame *post-mortem*, como aqueles que permanecem inexplicados após uma investigação completa, incluindo a realização de uma autópsia completa, análise do local de morte e revisão da história clínica. Estes últimos casos classificam-se dentro da subcategoria de síndrome da morte súbita infantil (“Sudden infant death syndrome” - SIDS), também denominada síndrome de morte súbita do lactente (SMSL), representando um diagnóstico de exclusão (Krous et al., 2004). As principais causas de SUDI são listadas abaixo:

- Síndrome da morte súbita infantil (SIDS): Nos EUA representa a maior causa de morte em crianças de um mês a um ano de idade e a terceira causa de mortalidade infantil, após anomalias congênitas e prematuridade/baixo peso ao nascer. Ocorre com maior frequência em crianças de dois a quatro meses de idade, geralmente em período de sono, não sendo causada por sufocamento, aspiração, abuso ou negligência (Shapiro-Mendoza, 2007).
- Asfixia ou sufocamento: A incapacidade de respirar conduz a uma falta de oxigenação que pode gerar perda de consciência e morte. As principais causas de asfixia reportada em crianças são o sufocamento acidental e o estrangulamento no leito (Shapiro-Mendoza, 2007).
- Lesão ou trauma: Podem ocorrer de forma intencional – abuso infantil - ou não-intencional (Deal, 2000).
- Causas desconhecidas ou inclassificáveis: Aplica-se como causa da morte se a investigação da cena da morte e/ou a autópsia foram incompletas ou não

realizadas e a declaração de óbito não possui evidência suficiente para registrar uma causa de morte mais específica (Shapiro-Mendoza, 2007).

- Doença metabólica: Erros inatos do metabolismo (EIM) afetam a síntese, transporte e degradação de moléculas podendo provocar o acúmulo de substâncias tóxicas ou a deficiência de substâncias necessárias para o funcionamento fisiológico normal (Shapiro-Mendoza, 2007).

1.2. Erros inatos do metabolismo

Os EIM – terminologia cunhada no ano de 1909 por Sir Archibald Edward Garrod – são um grupo de mais de 1000 distúrbios monogênicos que resultam da deficiência de uma determinada enzima, cofator ou proteínas de transporte, alterando o metabolismo de proteínas, ácidos graxos, carboidratos, bem como prejudicando o funcionamento normal de organelas (Pampols, 2010; Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018; Agana et al., 2018). A diminuição da atividade enzimática e o subsequente bloqueio total ou parcial de uma rota metabólica geralmente leva ao acúmulo do substrato, à falta do produto final ou ao desvio do substrato para rota metabólica alternativa (Saudubray et al., 2006).

Os indivíduos com EIM podem apresentar sintomatologia variada, sendo a gravidade do quadro clínico de cada paciente dependente da rota metabólica afetada, bem como do metabólito acumulado ou deficiente. Portanto, apesar de conformarem um único grupo de doenças, os EIM representam uma vasta, diversa e heterogênea coleção de condições que são uma causa significativa de morbidade e mortalidade, principalmente na infância. São, na sua grande maioria, doenças graves que podem levar o paciente a óbito quando não tratadas corretamente (Chuang e Shih, 2001; Gomes et al., 2005; Ezgu, 2016).

A grande maioria dos EIM apresenta um padrão de herança autossômico recessivo, com risco de recorrência de 25% para cada gestação de pais heterozigotos. A incidência e prevalência dos EIM varia entre países e, apesar de serem considerados individualmente raros, em conjunto apresentam uma incidência estimada em 1:800 (Mak et al., 2013; Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018; Agana et al., 2018).

Devido à sua raridade e à inespecificidade dos achados clínicos no momento do início dos sintomas, os EIM destacam-se por serem complexos em termos de diagnóstico e, por muitas vezes serem, ao contrário da maior parte das demais doenças genéticas, passíveis de tratamento em alguns casos (Giugliani, 1998; Kaku et al., 2018).

1.2.1 Erros inatos do metabolismo: Classificação

Os EIM podem ser classificados com base na idade de início, sinais e sintomas predominantes, principais órgãos ou sistemas afetados, assim como na acuidade ou cronicidade das manifestações. Segundo Saudubray e Garcia-Cazorla, os EIM classificam-se em duas grandes categorias. A categoria 1 inclui doenças que envolvem apenas um único sistema funcional (como sistema endócrino, sistema imune, ou fatores de coagulação) ou que afetam apenas um órgão ou sistema anatômico (intestino, túbulos renais, eritrócitos ou tecido conjuntivo). Os sintomas são uniformes e o diagnóstico é relativamente simples de ser estabelecido. A categoria 2, por sua vez, inclui doenças nas quais o defeito bioquímico base afeta uma via metabólica comum a um grande número de células ou órgãos (por exemplo, doenças lisossômicas) ou é restrita a um órgão, mas que desencadeia consequências sistêmicas ou humorais (por exemplo, defeitos do ciclo da ureia, glicogenose hepática). As doenças dessa categoria, por sua vez, podem ser divididas em três grupos (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018):

- Grupo 1: Distúrbios que afetam o metabolismo intermediário de pequenas moléculas.

Composto por doenças que afetam a rede de reações bioquímicas de catabolismo, anabolismo e reciclagem, a qual permite troca contínua entre células e nutrientes através da alimentação (carboidratos, lipídeos e proteínas) e da respiração (oxigênio). Inclui EIM que causam intoxicação aguda ou progressiva devido ao acúmulo de compostos próximos ao ponto de bloqueio metabólico, como, por exemplo, EIM do catabolismo de aminoácidos (fenilcetonúria, doença da urina do xarope do bordo, entre outros), a maioria das acidemias orgânicas (metilmalônica, propiônica, isolvalérica, entre outras), distúrbios do ciclo da ureia e

doenças relacionadas, defeitos no metabolismo de galactose, frutose e porfirias (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018)

- Grupo 2: Distúrbios que envolvem o metabolismo energético

Inclui EIM cujos sintomas, pelo menos parcialmente, levam à deficiência na produção ou uso de energia no fígado, miocárdio, músculo, cérebro e outros tecidos. Defeitos mitocondriais são os mais graves e geralmente não são passíveis de tratamento. Os sintomas podem envolver sinais de intoxicação agudos (geralmente acionados por jejum, catabolismo, febre) ou crônicos. Os defeitos citoplasmáticos são geralmente menos graves e incluem distúrbios da glicólise, do metabolismo do glicogênio e gliconeogênese, hiperinsulinismo e defeitos no transportador da glicose, distúrbios no metabolismo da creatina e EIM da via da fosfato pentose (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018).

- Grupo 3: Distúrbios envolvendo moléculas complexas

Inclui doenças que envolvem a síntese, processamento, controle de qualidade e catabolismo de moléculas complexas, processos que ocorrem em diversas organelas (mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi). Os sintomas são permanentes, geralmente progressivos e independentes de eventos intercorrentes ou da ingestão alimentar. O grupo inclui doenças de depósito lisossomal, distúrbios peroxissomais, erros inatos de purinas e pirimidinas, erros inatos da síntese do colesterol, distúrbios dos triglicerídeos, fosfolipídeos e glicosfingolipídeos, entre outros (Saudubray e Garcia-Cazorla, 2018).

1.2.2 Erros inatos do metabolismo: Sintomatologia

Os EIM apresentam um amplo espectro de sinais e sintomas, os quais podem manifestar-se em qualquer idade. O número de EIM conhecidos provavelmente seja tão grande quanto o número de sintomas que podem indicar um distúrbio metabólico e, por tanto, o diagnóstico de EIM é complexo para a maioria dos profissionais (Saudubray e Charpentier, 2001; Poretti et al., 2013).

Dias ou semanas após o nascimento, um neonato previamente saudável pode começar a apresentar sinais de uma doença metabólica oculta, os quais

podem ser comuns a outras condições médicas graves. Apesar do quadro clínico poder variar, neonatos e crianças com doenças metabólicas tipicamente apresentam letargia, diminuição do apetite, vômitos, taquipneia e convulsões. Com o progresso da doença, podem surgir anormalidades em relação ao tônus (hipo ou hipertonia), postura e movimentos, além de apneia do sono (Clarke, 2005; Kölker et al., 2015). Elevado nível plasmático de amônia, hipoglicemia e acidose metabólica são sugestivos de EIM. Adicionalmente, os cuidadores ou profissionais podem perceber um odor não usual no lactente, o qual pode estar associado a algumas doenças metabólicas (ex.: doença da urina do xarope do bordo, fenilcetonúria, acidemia isovalérica). Além disso, uma doença similar à Síndrome de Reye (encefalopatia hepática não-específica, possivelmente acompanhada de hipoglicemia) pode estar presente em anormalidades da gliconeogênese, da oxidação de ácidos graxos, da cadeia de transporte de elétrons ou de ácidos orgânicos (Raghuveer et al., 2006). Quando uma criança com EIM não diagnosticado vai à óbito, este fato é frequentemente atribuído a sepse (Lindor e Karnes, 1995).

1.2.3 Erros inatos do metabolismo associados à morte súbita inesperada na infância

Aqueles EIM cujas crises ocasionam intoxicação ou alterações que aumentam o risco de falência de órgãos constituem potenciais causas de SUDI (Emery et al., 1988; Kaku et al., 2018).

Estima-se que os EIM sejam responsáveis por cerca de 0,9% a 6% dos casos de SUDI (Boles et al., 1998; Chace et al., 2001; Van Rijt et al., 2016). No entanto, esse valor poderia ser maior, dada a complexidade do diagnóstico dessas doenças, combinada com a falta de experiência e de recursos para proceder com a investigação metabólica de SUDI, se refletindo num cenário de subinvestigação e subdiagnóstico (Cote et al., 1999; Loughrey et al., 2005).

De acordo com o trabalho de van Rijt e colaboradores (2016) são pelo menos 43 os EIM associados à SUDI e/ou síndrome de Reye, sendo que 26 destes apresentam manifestações clínicas no período neonatal, 32 são passíveis de tratamento e 26 diagnosticáveis por triagem neonatal através de espectrometria de

massas em *tandem* (MS/MS) A Tabela 1 mostra exclusivamente os EIM associados à SUDI.

Tabela 1. Erros inatos do metabolismo associados à SUDI.

Erro inato do metabolismo	Manifestação neonatal	Diagnóstico neonatal	Tratamento
<i>Metabolismo de aminoácidos e peptídeos</i>			
Distúrbios do ciclo da ureia			
Deficiência de carbamoilfosfato	+	+	+
Deficiência de ornitina transcarbamilase	+	+	+
Citrulinemia tipo I	+	+	+
Acidúria arginosuccínica	-	+	+
Acidemias orgânicas			
Acidemia glutárica	-	+	+
Acidemia metilmalônica	+	+	+
Acidemia isovalérica	-	+	+
Acidemia metilglutânica tipo II	+	+	+
Acidemia L-2-hidroxi glutárica	-	-	-
Metabolismo da fenilalanina e tirosina			
Tirosinemia tipo I	+	+	+
Metabolismo da glicina e serina			
Hiperglicinemia não cetótica	+	+	+
Transporte de aminoácidos			
Intolerância à proteína lisínica	-	-	+
<i>Metabolismo de carboidratos</i>			
Distúrbios da gliconeogênese			
Deficiência da fosfoenolpiruvato carboxiquinase	-	-	-
Doenças de depósito de glicogênio			
Glicogenose tipo Ia	+	-	+
Glicogenose tipo Ib	-	-	+
Glicogenose tipo II	-	+	+

Tabela 1. Erros inatos do metabolismo associados à SUDI (Continuação).

<i>Metabolismo de ácidos graxos e corpos cetônicos</i>			
Transporte da carnitina e do ciclo da carnitina			
Deficiência do transportador da carnitina	+	+	+
Deficiência de carnitina palmitoiltransferase I	+	+	+
Deficiência de carnitina-acilcarnitina translocase	-	+	+
Deficiência de carnitina palmitoiltransferase II	+	+	+
Beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos			
Deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa	+	+	+
Deficiência de proteína trifuncional mitocondrial	+	+	+
Deficiência de desidrogenase de 3-hidróxi-acil-CoA de cadeia longa	+	+	+
Deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média	+	+	+
Deficiência de 3-alfa-hidroxi-aci-ICoA	+	+	+
Deficiência de múltiplas acil-CoA desidrogenases	+	+	+
<i>Metabolismo energético</i>			
Cadeia respiratória mitocondrial			
Mutações de ponto no mtDNA	+	-	-
Deficiência de ubiquinona (CoQ10)	-	+	-
Deficiência do complexo I, responsiva à riboflavina	-	-	-
Deficiência do complexo I	-	-	-
Deficiência do complexo IV	+	-	-
<i>Metabolismo de vitaminas e cofatores (não-proteicos)</i>			
Metabolismo da biotina			
Deficiência de biotinidase	-	+	+
Deficiência de holocarboxilase sintetase	-	+	+

Fonte: van Rijt et al., 2016. + indica presença; - indica ausência.

Dentre os EIM associados à SUDI, a acidemia metilmalônica tipo mut⁰ (AMMmut⁰; #MIM 25100), a citrulinemia tipo I (CTLNI; MIM# 215700) e a deficiência de desidrogenase de 3-hidróxi-acil-CoA de cadeia longa (LCHADD; MIM# 609016), entre outros distúrbios não incluídos no Programa Nacional de Triagem Neonatal

(PNTN) (vide sessão 1.6.1.), apresentam uma ou mais variantes patogênicas que se destacam pela sua elevada prevalência (Tabela 2), e são descritos a seguir.

Tabela 2. Variantes patogênicas de maior prevalência para genes causadores de EIM associados à SUDI.

Erro inato do metabolismo	Enzima deficiente	Gene	Variantes patogênicas mais frequentes na população mundial
Acidemia glutárica tipo I	Glutaril CoA desidrogenase	<i>GCDH</i>	c.1204C>T (p.Arg402Trp)
Acidemia metilmalônica tipo mut ⁰	Metilmalonil-CoA mutase	<i>MUT</i>	c.655A>T (p.Asn219Tyr) c.1106AG>A (p.Arg369His)
Citrulinemia tipo I	Argininosuccinato sintetase	<i>ASS1</i>	c.1168G>A (p.Gly390Arg)
Deficiência da 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia longa	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase	<i>HADHA</i>	c.1528G>C (p.Glu510Gln)
Deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia média	Acil-CoA desidrogenase de cadeia média	<i>ACADM</i>	c.985A>G (p.Lys329Glu) c.199C>T (p.Tyr42His)
Deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa	Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa	<i>ACADVL</i>	c.848T>C (p.Val283Ala)
Glicogenose tipo Ia	Glicose-6-fosfatase	<i>G6PC</i>	c.247C>T (p.Arg83Cys) c.1039C>T (p.Gln347Ter)
Glicogenose tipo Ib	Defeito no transportador da glicose-6-fosfato	<i>SLC37A4</i>	c.1042_1043delCT
Glicogenose tipo II	α -glicosidase ácida	<i>GAA</i>	c.2560C>T (p.Arg854Ter) c.1935C>A (p.Asp645Glu) c.-32T>G
Tirosinemia tipo I	Fumarilacetoacetato hidrolase	<i>FAH</i>	c.1062+5G>A c.554-1G>T c.607-6T>G c.782A>C (p.Pro261Leu)

Fonte: Gene Reviews, 2019.

1.3. Acidemia metilmalônica tipo mut⁰ (AMMmut⁰)

A acidemia metilmalônica (AMM) é uma condição de etiologia heterogênea que afeta o catabolismo do propionato, representando um dos distúrbios mais prevalentes do metabolismo dos ácidos orgânicos (Caterino et al., 2016). A AMM pode se manifestar em combinação com homocistinúria ou de forma isolada, sendo esta última a mais frequente. A AMM isolada pode ser ocasionada tanto pela deficiência parcial ou total da enzima metilmalonil-CoA mutase (incluindo os subtipos mut e mut⁰, respectivamente), como por defeitos na síntese e transporte do seu cofator, adenosilcobalamina (AdoCbl) (Fenton et al., 2001; Dionisi-Vici et al., 2006; Han et al., 2015).

A AMMmut⁰ foi descrita pela primeira vez no ano de 1967 por Oberholzer e colaboradores. A incidência estimada é de cerca de 1:100.000, com base nos dados de triagem neonatal dos EUA e Taiwan (Niu et al., 2010; Feuchtbaum et al., 2012).

1.3.1. Fisiopatologia

O catabolismo dos aminoácidos isoleucina, valina, treonina e metionina, assim como dos ácidos graxos de número ímpar de carbonos e da cadeia lateral do colesterol, resulta na formação de propionil-CoA, que será incorporado no ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Essa reação ocorre através de uma série de três etapas enzimáticas reversíveis da via do propionato, no interior da matriz mitocondrial (Fenton et al., 2001) (Figura 1).

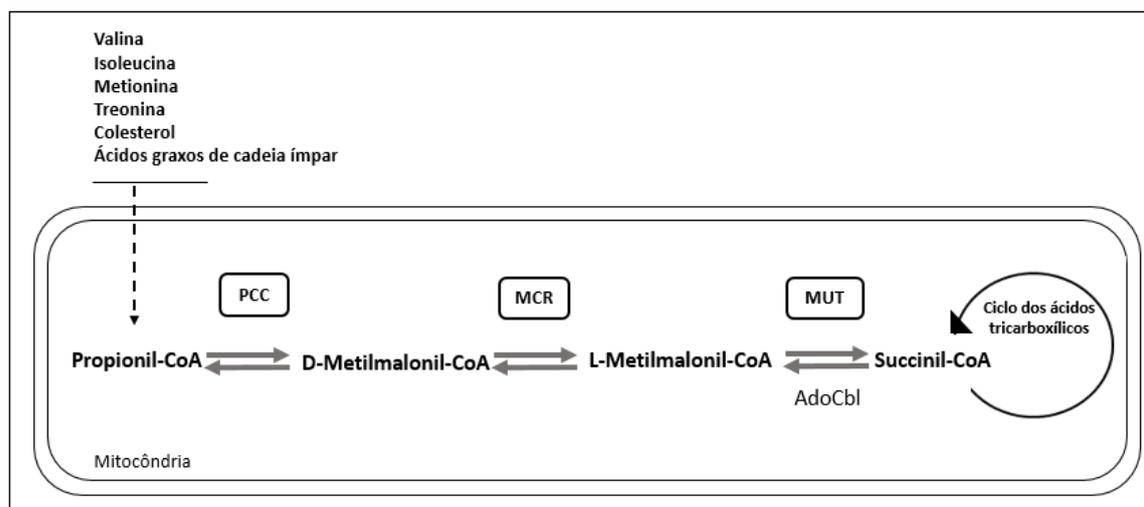


Figura 1. Representação esquemática da via do Propionato. PCC- Propionil-CoA carboxilase, MCR- Metilmalonil-CoA epimerase, MUT- Metilmalonil-CoA mutase, AdoCbl adenosilcobalamina (Adaptado de Acquaviva et al., 2005).

A primeira etapa consiste na conversão de propionil-CoA em D-metilmalonil-CoA, pela enzima propionil-CoA carboxilase (PCC; EC 6.4.1.3). Em seguida, a isomerização para L-metilmalonil-CoA é efetuada pela metilmalonil-CoA epimerase (MCR; EC 5.1.99.1). Finalmente, a enzima metilmalonil-CoA mutase (MUT; EC 5.4.99.2) catalisa a conversão de L-metilmalonil-CoA em succinil-CoA, que funciona como intermediário do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Fenton et al., 2001; Fowler et al., 2008).

Na AMMmut⁰, a atividade residual da enzima MUT é nula, não sendo responsiva à AdoCbl, isto leva ao acúmulo de uma série de metabolitos tóxicos em diversos fluidos e tecidos, principalmente propioilcarnitina e metilmalonil-CoA, o qual é subsequentemente hidrolisado em CoA e ácido metilmalônico (Fowler et al., 2008). O acúmulo de ácido metilmalônico induz a formação de ácido metilcítrico, inibidor de enzimas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, e malonato, inibidor da enzima succinato desidrogenase, provocando estresse oxidativo, apoptose excitotóxica e disfunção mitocondrial (Fontella et al., 2000; Okun et al., 2002; Mirandola et al., 2008). Conseqüentemente, a AMM é caracterizada por apresentar dano tecidual generalizado, com efeitos proeminentes no cérebro, possivelmente devido a sua dependência no metabolismo aeróbico, e ao fato do ácido

metilmalônico ser acumulado em maior concentração no mesmo (Baulny et al., 2005; Saad et al., 2006).

1.3.2. Manifestações clínicas

A AMMmut⁰ representa uma condição extremamente severa, associada à elevada morbidade e mortalidade precoce. A maioria dos pacientes apresenta sinais e sintomas clínicos nas primeiras semanas de vida, incluindo episódios intermitentes de descompensação metabólica aguda, potencialmente fatais, em decorrência do catabolismo induzido pela elevada ingestão de proteína (Hörster e Hoffmann, 2004; Fraser e Venditti, 2016). As crises metabólicas, frequentemente confundidas com septicemia, são caracterizadas por cetoacidose, hiperamonemia, dificuldades de alimentação, letargia e hipotonia, geralmente progredindo para um estado comatoso, com apneia e episódios de convulsão. Complicações a longo prazo incluem atraso no desenvolvimento, insuficiência renal crônica, pancreatite e manifestações neurológicas severas (Hörster et al., 2007; Manoli et al., 2013).

1.3.3. Aspectos moleculares

Trata-se de um distúrbio de herança autossômica recessiva ocasionado por variantes patogênicas no gene *MUT*, que codifica a enzima mitocondrial MUT (Ledley et al., 1988). A enzima é composta por 750 aminoácidos, com peso molecular de 77,5kDa, e apresenta dois domínios funcionais. O domínio amino-terminal é responsável pela interação com a metilmalonil-CoA, enquanto que o domínio carboxi-terminal contém o sítio de ligação para o cofator AdoCbl (Froese et al., 2010). O gene *MUT* abrange 35Kb no cromossomo 6p21 e está composto por 13 éxons, o primeiro deles não codificante (Ledley et al., 1988; Nham et al., 1990). Até o momento mais de 80 variantes foram descritas em associação exclusiva com a AMMmut⁰ e, dentre as mesmas, as substituições c.655A>T (Acquaviva et al., 2001) e c.1106G>A (Worgan et al., 2006) destacam por sua prevalência, principalmente entre pacientes caucasoides (Figura 2).

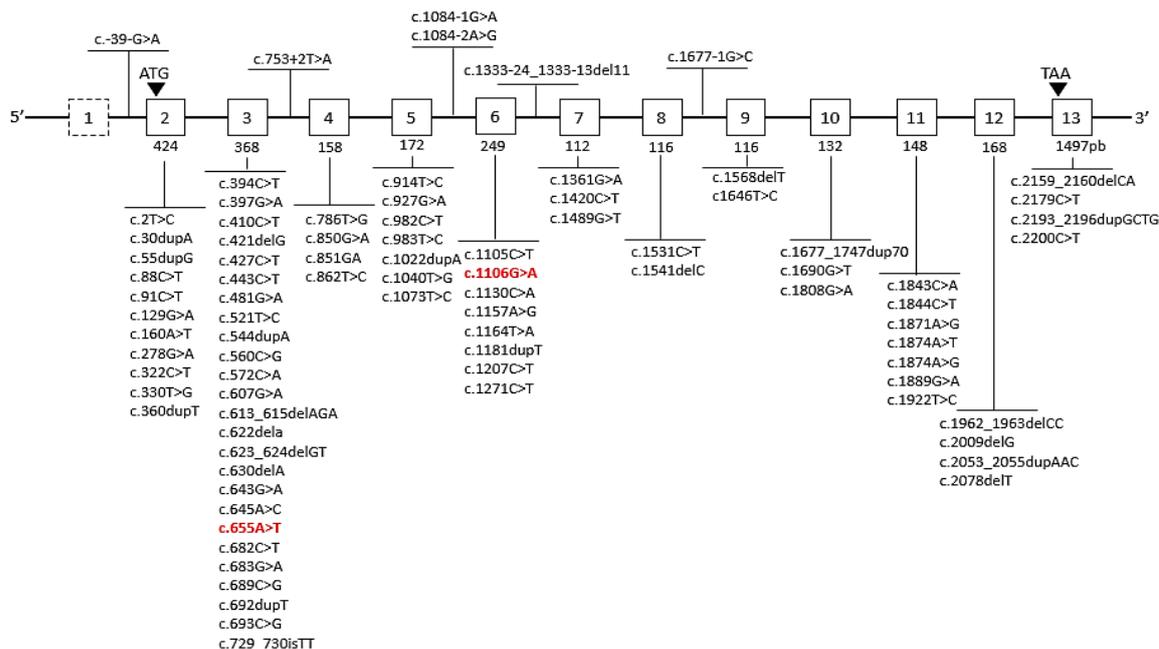


Figura 2. Representação esquemática da localização das variantes associadas à acidemia metilmalônica *mut*⁰ no gene *MUT*. Os éxons são representados em caixas com suas dimensões em pares de bases (pb). Os íntrons são representados em linhas. As variantes são listadas abaixo dos respectivos éxons e acima dos respectivos íntrons. Em vermelho as variantes patogênicas de maior prevalência. Sequências de referência utilizadas NG_007100.1 e NM_000255.3. (Adaptado de Forny et al., 2016; Stojiljkovic et al., 2016).

A variante c.655A>T, localizada no éxon 3, resulta na substituição de um resíduo de asparagina por tirosina na posição 219 da proteína (p.Asn219Tyr). A mesma representa até 26% dos alelos em pacientes diagnosticados com AMM*mut*⁰ (Acquaviva et al., 2005). Já a variante c.1106G>A, no éxon 6, leva à substituição de arginina por histidina na posição 369 (p.Arg369His) e corresponde a cerca de 10% dos pacientes tipo *mut*⁰ (Forny et al., 2016). As duas variantes são localizadas no domínio de interação com o substrato, de maneira que, tanto em homozigose como em heterozigose composta com outra variante patogênica, desestabilizam a estrutura tridimensional da enzima, anulando sua atividade catalítica (Acquaviva et al., 2005; Sakamoto et al., 2007; Zsengellér et al., 2014).

1.3.4. Diagnóstico

A determinação dos níveis de ácido metilmalônico e outros ácidos orgânicos, através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, é a metodologia mais amplamente utilizada para o diagnóstico de AMM em indivíduos

sintomáticos (Fowler et al., 2008). No entanto, a dosagem de acilcarnitinas no sangue, pela técnica de MS/MS, pode ser utilizada para identificar indivíduos afetados na fase pré-sintomática. A mesma permite detectar o incremento no nível de propionilcarnitina (C3), marcador primário para a AMM e outras acidemias orgânicas (Chace et al., 2001). A proporção propionilcarnitina/acetilcarnitina (C3/C2) é frequentemente utilizada como marcador secundário para AMM (Al-Dirbashi et al., 2016).

A confirmação do diagnóstico, bem como a discriminação entre os subtipos mut^- e mut^0 , pode ser realizada através de uma série de ensaios bioquímicos para a determinação da atividade da enzima MUT em fibroblastos, assim como pela análise do gene *MUT* (Fowler et al., 2008).

1.3.5. Tratamento

Na ausência de tratamento precoce a maioria dos pacientes não responsivos à AdoCbl vão a óbito. A estratégia terapêutica consiste fundamentalmente na restrição da ingestão de proteínas naturais, com a administração de suplementos dietéticos isentos de aminoácidos propiogênicos, visando reduzir assim o acúmulo de metabólitos tóxicos (Hörster e Hoffmann, 2004). A eliminação dos metabólitos pode ser efetuada, quando necessário, por medidas mais ou menos agressivas (ex: transfusão sanguínea, diálise peritoneal, hemofiltração ou hemodiálise) (Baulny et al., 2005). Adicionalmente, a suplementação com L-carnitina auxilia na remoção do excesso de acil-CoA através da produção de acilcarnitinas orgânicas de excreção urinária, reestabelecendo os níveis de CoA livre (Ribas et al., 2010). A prevenção de situações favorecedoras do catabolismo, como o jejum prolongado e as infecções, são de primordial importância neste contexto (Hörster e Hoffmann, 2004; Dionisi-Vici et al., 2006).

1.4. Citrulinemia tipo I (CTLNI)

A CTLNI, descrita por primeira vez por McMurray e colaboradores em 1962, é o terceiro distúrbio mais prevalente do ciclo da ureia. Com base em dados de diversos programas de triagem neonatal sua incidência foi estimada em 1:250.000 (Summar et al., 2013).

A CTLNI pode ser classificada em duas categorias: CTLNI clássica, com manifestações clínicas severas de início precoce ou tardio, e CTLNI leve, assintomática na maioria dos casos (Häberle et al., 2003).

1.4.1. Fisiopatologia

O ciclo da ureia é a principal via para a eliminação do excesso de nitrogênio, sendo também responsável pela biossíntese *de novo* da arginina. O mesmo consiste em cinco etapas enzimáticas sequenciais, que ocorrem principalmente nos hepatócitos, e resultam na conversão de amônia e outros compostos nitrogenados em ureia, um produto não-tóxico de excreção urinária (Figura 3) (Brusilow e Horwich, 2001).

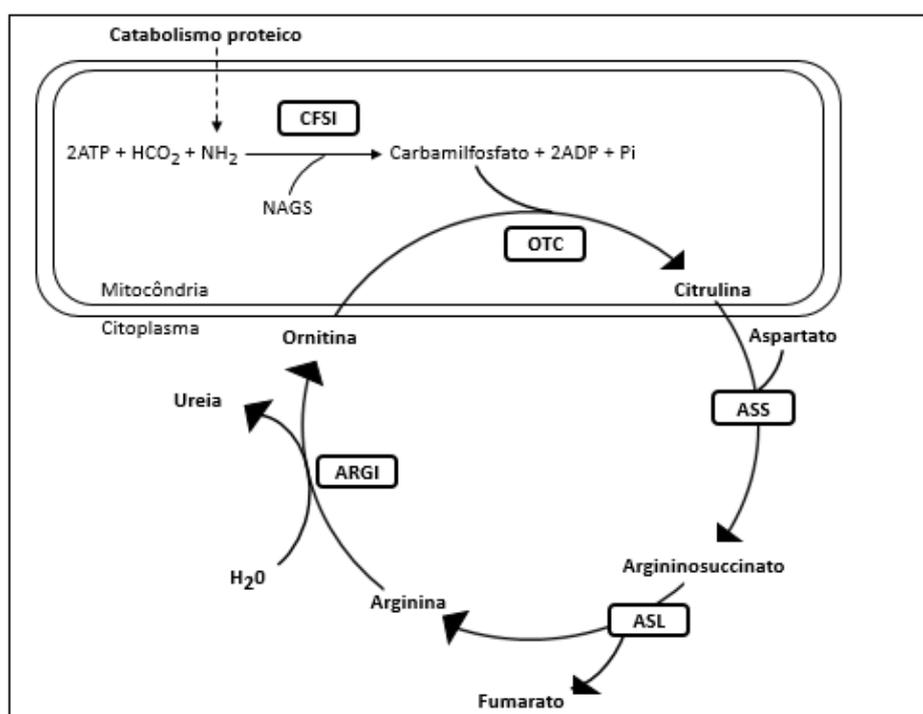


Figura 3. Representação esquemática do ciclo da ureia. CFSI- carbamilsulfato sintetase, NAGS- N-acetil glutamato sintetase, OTC- ornitina carbamiltransferase, ASS- argininosuccinato sintetase, ARG1- arginase (Adaptado de Blair et al., 2014).

Na primeira etapa a amônia, derivada principalmente de glutamina e glutamato, é convertida em carbamilsulfato pela enzima mitocondrial

carbamilfosfato sintetase (CFSI; EC 6.3.4.16), através da condensação de acetil-CoA e glutamato catalisada pela N-acetilglutamato sintetase (NAGS; EC 2.3.1.1). Em seguida, a enzima mitocondrial ornitina carbamiltransferase (OTC; EC 2.1.3.3) catalisa a condensação entre carbamilfosfato e ornitina, produzindo citrulina. Já no citoplasma, a citrulina condensa-se com aspartato para produzir argininosuccinato, pela ação da enzima argininosuccinato sintetase (ASS; EC 6.3.4.5). O argininosuccinato é então hidrolisado a arginina e fumarato pela argininosuccinato liase (ASL; EC 4.3.2.1). Finalmente, a enzima arginase (ARGI; EC 3.5.3.1) hidrolisa a arginina em ornitina e ureia (Summar e Tuchman, 2001).

A CTLNI é ocasionada pela deficiência na atividade da enzima ASS (Beaudet et al., 1986), resultando em hiperamonemia, acúmulo de citrulina, glutamina, alanina e ácido orótico, com depleção de arginina (Häberle et al., 2012).

A amônia, metabolizada em glutamina nos astrócitos, no fígado e no músculo esquelético, é extremamente tóxica quando presente em elevadas concentrações, podendo ocasionar danos irreversíveis no cérebro em desenvolvimento. O acúmulo de glutamina nos astrócitos devido ao conseqüente incremento da osmolaridade intracelular seria uma das principais causas de dano cerebral (Brusilow et al., 2010). Além disso, a hiperamonemia induz o bloqueio do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, leva à apoptose excitotóxica e apresenta efeito tóxico direto sobre a neurotransmissão inibitória e excitatória (Cooper, 2001; Felipo e Butterworth, 2002; Tofteng et al., 2006).

1.4.2. Manifestações clínicas

A sintomatologia da CTLNI decorre principalmente da hiperamonemia, com quadros variáveis de encefalopatia e disfunção hepática, sendo a forma clássica de início precoce a mais severa. As manifestações clínicas incluem recusa alimentar, êmese, taquipneia, convulsões, edema cerebral e letargia, progredindo rapidamente para coma (Leonard e Morris, 2002; Gropman et al., 2007). Esta inespecificidade de sintomas pode sugerir o diagnóstico de sepse (Leonard, 2006). Na ausência de tratamento um número significativo de pacientes vão a óbito durante o período neonatal/infantil (Lee et al., 2013).

A forma clássica de início tardio caracteriza-se principalmente por disfunção hepática grave, distúrbios de aprendizagem e do desenvolvimento (Faghfoury et al., 2011), enquanto que indivíduos com a forma leve da doença podem ser assintomáticos, apresentando crises metabólicas agudas em períodos de estresse fisiológico (Gao et al., 2003).

1.4.3. Aspectos moleculares

A CTLNI é um distúrbio monogênico com padrão de herança autossômico recessivo, ocasionado por variantes patogênicas no gene *ASS1*, que codifica para a enzima ASS (McMurray et al., 1962). A enzima ASS apresenta uma estrutura tetramérica, constituída por monômeros de 46kDa e 412 aminoácidos, cada um contendo três domínios funcionais: um domínio amino-terminal de ligação ao ATP, um domínio catalítico e um domínio carboxi-terminal, responsável pela oligomerização da proteína (Karlberg et al., 2008).

O gene *ASS1* se encontra no cromossomo 9q34.1, abrange um total de 63Kb e contem 16 éxons, com o sitio de início de tradução localizado no éxon 3 (Freytag et al., 1984; Häberle et al., 2002). Existem aproximadamente 10 a 14 pseudogenes distribuídos pelo genoma, no entanto, apenas a sequência no cromossomo 9 seria funcional (Su et al., 1984). Mais de 100 variantes patogênicas foram descritas até o momento no gene *ASS1*, sendo a substituição c.1168G>A no éxon 15 a mais prevalente em diversos grupos étnicos (Diez-Fernandez et al., 2017) (Figura 4).

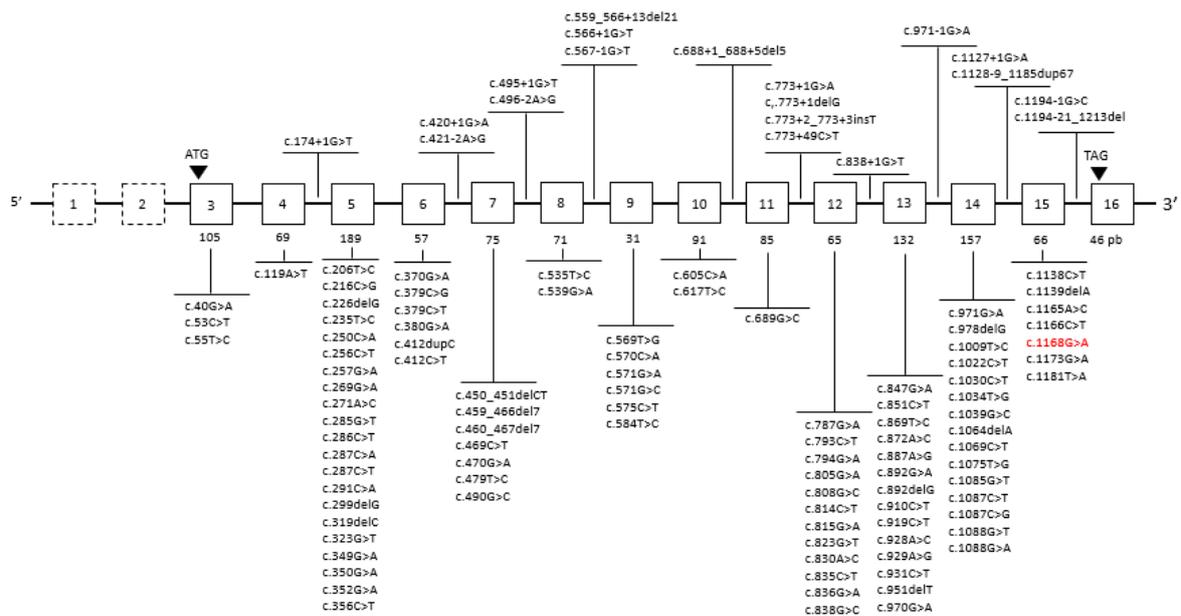


Figura 4. Representação esquemática da localização das variantes associadas à citrulinemia tipo I no gene *ASS1*. Os éxons são representados em caixas com suas dimensões em pares de bases (pb). Os íntrons são representados em linhas. As variantes são listadas abaixo dos respectivos éxons e acima dos respectivos íntrons. Em vermelho a variante patogênica de maior prevalência. Sequencias de referência utilizadas NG_011542.1 e NM_000050.4. Fonte: Gao et al., 2003; Engel et al., 2009; Kose et al., 2017; Bijarnia-Mahay et al., 2018.

A variante c.1168G>A resulta na substituição de um resíduo de glicina por arginina na posição 390 da proteína (p.Gly390Arg), localizada no domínio de oligomerização. Essa alteração compromete a conformação tetramérica tridimensional da enzima, provocando a inativação catalítica da mesma (Berning et al., 2008). Em homozigose esta variante associa-se à CTLNI clássica severa, de início precoce (Gao et al., 2003; Engel et al., 2009; Laróvere et al., 2012), já em heterozigose composta com outra variante patogênica, pode estar relacionada tanto com a forma severa quanto com formas mais leves da doença (Gao et al., 2003).

A variante representa até 62% dos alelos em pacientes europeus clinicamente diagnosticados, e foi identificada em 100% dos alelos de pacientes analisados no estado de San Luis, Argentina (Laróvere et al., 2012; Diez-Fernandez et al., 2017).

1.4.4. Diagnóstico

A dosagem de citrulina em sangue pode ser efetuada através de MS/MS. Um valor elevado pode ser indicativo de CTLNI, entre outras condições como CTLN tipo II, acidúria argininosuccínica e deficiência de piruvato carboxilase (Woo et al., 2014). O diagnóstico diferencial e a confirmação de CTLNI são realizados com base nos níveis elevados de amônia em plasma e ácido orótico em urina, bem como pela determinação da atividade da enzima ASS em fibroblastos ou tecido hepático e a análise do gene *ASS1* (Leonard, 2006).

1.4.5. Tratamento

Devido à elevada mortalidade e às sequelas neurológicas irreversíveis decorrentes da hiperamonemia associada à CTLNI, o início imediato do tratamento torna-se fundamental para a sobrevivência dos pacientes (Uchino et al., 1998; Summar e Tuchman, 2001).

A abordagem terapêutica baseia-se na remoção do excesso de amônia, limitando também sua produção através do metabolismo proteico (Blair et al., 2014). A mesma inclui uma dieta vitalícia restrita em proteínas com suplementação de aminoácidos essenciais e a reversão do catabolismo via infusão intravenosa de glicose, quando necessário (Rocha et al., 2009; Lee et al., 2013). Tanto a hemodiálise como a terapia farmacológica com administração de arginina, benzoato de sódio ou fenilbutirato de sódio são utilizadas visando a eliminação do excesso de nitrogênio em episódios intercorrentes de hiperamonemia (Schwartz et al., 2008; Rocha et al., 2009). O transplante hepático ortotópico dentro dos primeiros três meses de vida é efetivo em determinados casos (Whittington et al., 1998).

1.5. Deficiência de desidrogenase de 3-hidróxi-acil-CoA de cadeia longa (LCHADD)

A LCHADD foi descrita por primeira vez por Wanders e colaboradores (1989) e representa um dos distúrbios da beta-oxidação de ácidos graxos (“fatty acid beta-oxidation disorders”; FAOD) mais graves (Rinaldo et al., 2002). Sua incidência foi estimada em 1:250.000, com base nos dados combinados de triagem neonatal por MS/MS da Austrália, Alemanha e EUA (Lindner et al., 2010).

1.5.1. Fisiopatologia

Os ácidos graxos (AG) são uma fonte de energia fundamental na resposta fisiológica à depleção de energia nos tecidos em períodos de jejum, doença febril e aumento de atividade muscular. Constituem, em condições fisiológicas normais, o principal recurso energético para o coração, o músculo esquelético e os rins. Portanto, desempenham um papel crucial no período neonatal, considerando a limitada reserva de glicogênio e alta taxa metabólica que o caracteriza (Rinaldo et al., 2002; Wanders et al., 2010; Houten et al., 2016).

A beta-oxidação mitocondrial é a principal via para a degradação de AG, desempenhando também um papel relevante no metabolismo intermediário do fígado (Eaton et al., 1996; Vockley e Whiteman 2002; Wanders et al., 2010).

O processo de beta-oxidação inicia com a ativação dos AG plasmáticos de cadeia longa (comprimentos de cadeia de átomos de carbono entre C14 a C20) na forma de ésteres de Coenzima A (acil-CoA). Em seguida, os mesmos são carregados por proteínas de ligação através do citoplasma para a mitocôndria, e translocados para dentro da matriz mitocondrial por canais de carnitina. Os AG de cadeia curta e média (C4 a C12) ingressam na matriz mitocondrial sem precisarem do sistema de transporte da carnitina. No interior da mitocôndria inicia-se a espiral de beta-oxidação, uma série cíclica de quatro etapas enzimáticas que resulta na remoção sequencial de unidades de dois carbonos na forma de acetil-CoA. Para a degradação completa dos AG, atuam diferentes enzimas, específicas do comprimento de cadeia de átomos de carbono (Rector et al., 2008) (Figura 5).

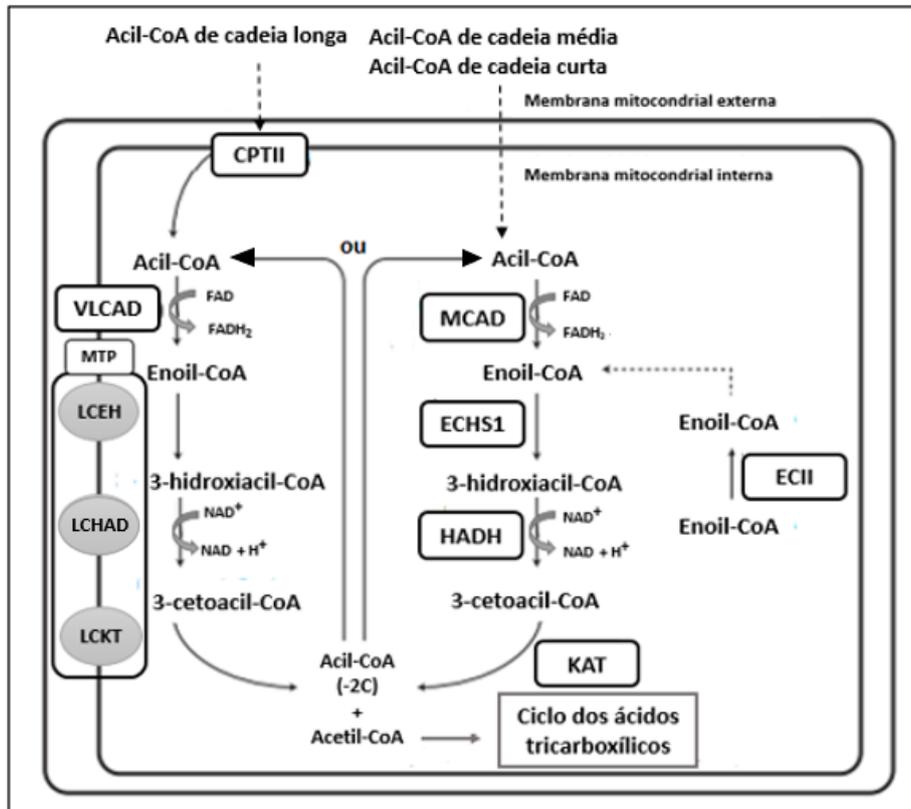


Figura 5. Representação esquemática da espiral de beta-oxidação dos ácidos graxos. VLCAD- acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa, MPT- proteína trifuncional mitocondrial, LCEH- 2,3-enoil-CoA hidratase de cadeia longa, LCHAD- desidrogenase de 3-hidróxi-acilCoA de cadeia longa, LCKT- 3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia longa, SCAD/MCAD/LCAD- acil-CoA desidrogenase de cadeia curta/média/longa, SCEH- enoil-CoA hidratase de cadeia curta, SCHAD- desidrogenase de 3-hidróxi-acilCoA de cadeia curta, KT- ketotiolase (Adaptado de Tyni e Pihko, 1999; Nsiah-Sefaa e Mckenzie, 2016).

A primeira etapa consiste na desidrogenação de acil-CoA, catalisada pela acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD; EC 1.3.8.9) e suas enzimas homólogas, acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCAD; EC 1.3.8.8), média (MCAD, EC 1.3.8.7) e curta (SCAD; EC 1.3.8.1), com produção de enoil-CoA. Em seguida, uma molécula de água é adicionada pela 2,3-enoil-CoA hidratase de cadeia longa (LCEH; EC 4.2.1.74) ou curta (SCEH; EC 4.2.1.150), enquanto que as desidrogenases de 3-hidróxi-acilCoA de cadeia longa (LCHAD; EC 1.1.1.2.11) ou curta (SCHAD; EC 1.1.1.35) produzem 3-cetoacil-CoA oxidando a posição 3-hidróxi. Finalmente, A 3-cetoacil-CoA tiolase (KAT; EC 2.3.1.16) de cadeia longa

(LKAT), média (MKAT) ou curta (SKAT) reduz o substrato de acil-CoA graxo pela clivagem de um resíduo de acetil-CoA (Rector et al., 2008; Wanders et al., 2010).

As três reações enzimáticas subsequentes à ação da VLCAD são catalisadas pela proteína trifuncional mitocondrial (MTP), um complexo heterooctamérico ($\alpha_4\beta_4$) associado à membrana mitocondrial interna. A subunidade alfa do complexo contém as enzimas LCEH e LCHAD, já a subunidade beta contém a enzima LKAT (Carpenter et al., 1992). Embora a atividade das três enzimas do complexo podem ser deficientes (deficiência geral de MTP; #MIM 609015), a deficiência isolada de LCHAD é a mais frequente (Ijlst et al., 1994).

A LCHADD resulta na oxidação incompleta de AG de cadeia longa, levando ao acúmulo de intermediários tóxicos de 3-hidróxiacil, a maioria deles não esterificados, o que afeta o funcionamento da cadeia respiratória. A disponibilidade de acil-CoA de cadeia média é reduzida e, conseqüentemente, a produção de acetil-CoA é limitada. Normalmente, como produto da beta-oxidação, o acetil-CoA ingressa como substrato para o ciclo dos ácidos tricarbóxicos, oxidando-se para gerar ATP, necessário no fígado para a síntese de glicose a partir de substratos como lactato e alguns aminoácidos (substratos que não carboidratos) pela gliconeogênese. Esse método de produção de glicose é vital para a manutenção plasmática de glicose – o principal combustível para o funcionamento do sistema nervoso central (SNC). O acetil-CoA também pode ser convertido em corpos cetônicos no fígado. Apesar da glicose ser o combustível de escolha para o funcionamento do SNC, os corpos cetônicos podem ser utilizados durante longos períodos de jejum. Além disso, o ATP também é necessário para outras funções metabólicas vitais, incluindo a conversão de amônia em ureia no fígado (Bhagavan, 2002).

1.5.2. Manifestações clínicas

Na ausência de tratamento, tanto a deficiência geral de MTP como a LCHADD, estão associadas à uma elevada mortalidade e morbidade. Os sintomas clínicos se desenvolvem principalmente durante períodos de doença ou jejum. Alguns dos casos apresentam doença hepática grave, incluindo falha renal aguda em recém-nascidos e falha renal crônica na infância, algumas vezes progredindo

para cirrose. Outras complicações observadas durante episódios de descompensação aguda são hipoglicemia hipocetótica, acidose láctica, hipotonia, cardiomiopatia, rabdomiólise e/ou mioglobinúria e morte súbita (Rinaldo et al., 2002; Spiekerkoetter, 2010). Complicações a longo prazo incluem episódios recorrentes de crises metabólicas, cardiomiopatia, dificuldades de alimentação, neuropatia periférica e retinopatia (Sykut-Cegielska et al., 2011).

1.5.3. Aspectos moleculares

A LCHADD é um distúrbio monogênico de herança autossômica recessiva, ocasionado por variantes patogênicas no gene *HADHA*, que codifica para a subunidade alfa da MTP, com 763 aminoácidos e 78KDa. O gene é localizado no cromossomo 2p23 e contém 20 éxons, abrangendo 52Kb (Wanders et al., 1989; Yang et al., 1996). Cerca de 60 variantes foram descritas em associação à LCHADD, sendo a substituição c.1528G>C, no éxon 15, a mais prevalente (Sims et al., 1995; Nedoszytko et al., 2017) (Figura 6).

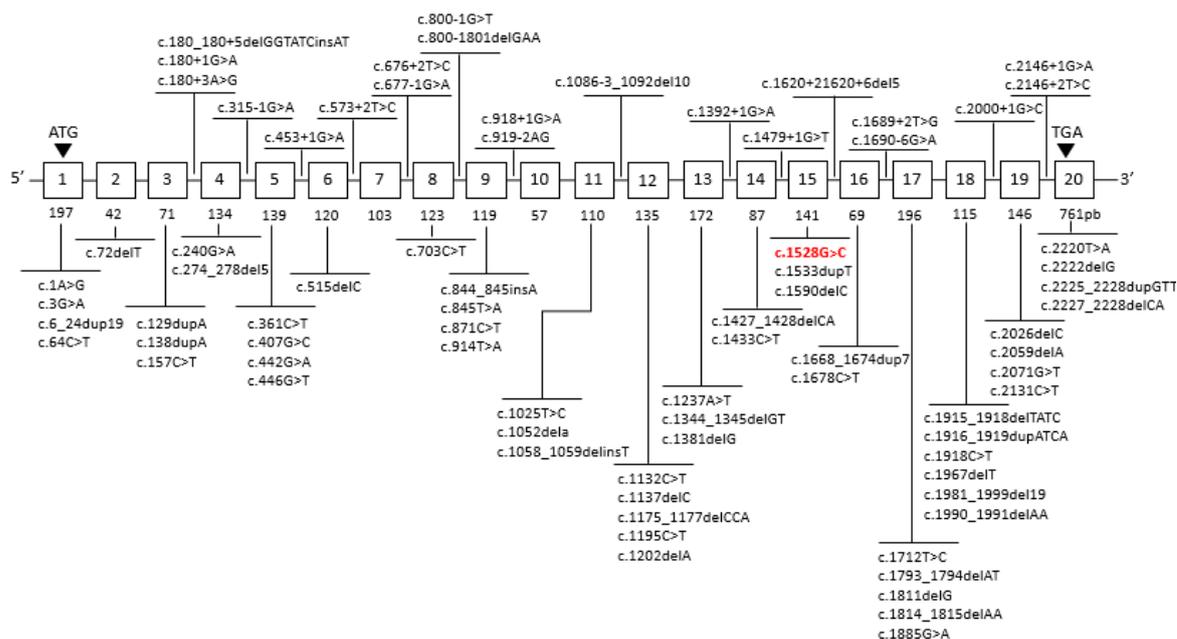


Figura 6. Representação esquemática da localização das variantes associadas à deficiência de 3-hidróxi-acil-CoA de cadeia longa no gene *HADHA*. Os éxons são representados em caixas com suas dimensões em pares de bases (pb). Os íntrons são representados em linhas. As variantes são listadas abaixo dos respectivos éxons e acima dos respectivos íntrons. Em vermelho a variante patogênica de maior prevalência. Sequencias de referência utilizadas NG_007121.1 e NM_000182.4. Fonte: Wanders et al., 1989; Choi et al., 2007; Gregersen e Olsen, 2010; Boutron et al., 2011; Bo et al., 2017; Bursle et al., 2017).

Esta variante resulta na substituição de ácido glutâmico por glutamina na posição 510 da subunidade alfa (p.Glu510Gln), dentro da região catalítica da LCHAD, levando à depleção da atividade de desidrogenase, com atividade normal de hidratase e atividade de tiolase moderadamente diminuída (Ijlst et al., 1994). A variante representa até 87% dos alelos em pacientes caucasoides clinicamente diagnosticados com LCHADD, incluindo casos de morte súbita, tanto em homozigose como em heterozigose composta com outra variante patogênica (Ijlst et al., 1996; Nedoszytko et al., 2017).

1.5.4. Diagnóstico

A dosagem de acilcarnitinas no sangue por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) ou cromatografia líquida (HPLC) permite detectar o perfil característico de indivíduos com LCHADD e deficiência geral de MTP, o qual reflete o acúmulo de 3-hidróxi-palmitoilcarnitina (C16-OH) e 3-hidróxi-oleoilcarnitina (C18:1-

OH) como marcadores primários de ambas condições (Sweetman et al., 2006). A confirmação do diagnóstico pode ser feita através da determinação da atividade enzimática de LCHAD em fibroblastos, tecido muscular ou hepático, bem como por análise do gene *HADHA* (Olpin et al., 2005; Kasper et al., 2010).

1.5.5. Tratamento

O tratamento, tanto para a LCHAD como para a deficiência geral de MTP, é relativamente simples e efetivo, principalmente quando iniciado precocemente. Consiste em evitar períodos de jejum, especialmente durante situações de catabolismo acelerado, associado à dieta hipercalórica com redução da ingestão de ácidos graxos de cadeia longa e suplementação com ácidos graxos de cadeia média (Spiekerkoetter et al., 2009). A suplementação com L-carnitina visando a excreção urinária dos metabolitos tóxicos acumulados, é ainda controversa pois poderia incrementar a concentração de acilcarnitinas de cadeia longa com potencial efeito arritmogênico (Primassin et al. 2008; Derks et al., 2014).

1.6. Triagem neonatal

A triagem neonatal é um programa de saúde populacional que tem como objetivo identificar doenças no recém-nascido, em tempo oportuno para permitir a intervenção adequada, garantindo tratamento e acompanhamento contínuo nos casos de diagnóstico positivo, com vistas a reduzir a morbimortalidade e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos (Therrell, 2001). O sistema de triagem neonatal iniciou-se na década de 60 com o rastreio da fenilcetonúria, um distúrbio metabólico para o qual o diagnóstico precoce e o tratamento pré-sintomático podem efetivamente evitar o desenvolvimento de sequelas neurológicas em indivíduos afetados. A fenilcetonúria, por tanto, foi considerado o modelo tradicional de doença passível de ser detectada por triagem neonatal (Wilson e Jungner, 1968).

Em 1967, a Organização Mundial de Saúde definiu os critérios de Wilson e Jungner para que uma doença fosse candidata a fazer parte de programas de triagem neonatal, a saber: a doença deve representar um importante problema de saúde pública, deve existir tratamento disponível, infraestrutura para confirmação diagnóstica e tratamento, assim como um período pré-sintomático em que a

intervenção melhore o desfecho. Adicionalmente, o teste de triagem deve ser adequado e confiável, a história natural da doença deve ser bem conhecida, deve haver um protocolo que estabeleça quem deve efetivamente ser tratado como paciente, o programa deve ser custo-efetivo, e a busca de casos deve ser um processo contínuo (Andermann et al., 2008).

A introdução de novas técnicas laboratoriais, como a utilização de cartões de papel filtro para coleta de amostras de sangue e o advento do espectrômetro de massas em *tandem*, permitiu a ampliação do acesso ao teste em grandes populações, incrementando exponencialmente as possibilidades diagnósticas (Botler et al., 2010).

1.6.1 Triagem neonatal no Brasil

A Triagem Neonatal – Teste do Pezinho – foi incorporada ao Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 1992, incluindo a avaliação para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito. No ano de 2001, o Ministério da Saúde, através da Secretaria de Assistência à Saúde, empenhou-se na reavaliação da Triagem Neonatal no SUS, o que culminou na publicação da portaria ministerial (Portaria GM/MS n.º 822, de 6 de junho de 2001) que criou o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) (BRASIL, 2001).

O PNTN é um programa de rastreamento populacional que visa promover e implementar a triagem neonatal no âmbito do SUS, visando ao acesso universal, integral e equânime, com foco na prevenção, na intervenção precoce e no acompanhamento permanente quando necessário (BRASIL, 2001).

A triagem neonatal na rede pública nacional rastreia 6 doenças: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito primário, anemia falciforme (e outras hemoglobinopatias), fibrose cística, hiperplasia adrenal congênita e deficiência de biotinidase (BRASIL, 2012). Entretanto, para o Distrito Federal, foi aprovada em 2008 a lei n.º 4.190, que torna obrigatório o teste do pezinho ampliado em todas as crianças nascidas, incluindo a triagem por MS/MS de 27 doenças, dentre elas, defeitos de beta-oxidação de ácidos graxos, toxoplasmose congênita, galactosemia e leucínose (BRASIL, 2008). No âmbito privado, também é possível a realização desta denominada triagem neonatal ampliada.

CAPITULO II JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Os EIM seriam responsáveis por até 6% dos casos de SUDI (Green et al., 2002); no entanto, a relação entre EIM e SUDI poderia estar sendo subestimada, tanto pela complexidade do diagnóstico dessas doenças, como pelas dificuldades inerentes ao processo de investigação desse tipo de óbitos.

A AMMmut⁰, assim como a CTLNI e a LCHADD, fazem parte da fração dos EIM relacionada à SUDI (van Rijt et al., 2016), e as suas principais variantes patogênicas já foram identificadas. Visto que estes EIM não estão incluídos no PNTN e que não há qualquer estudo na literatura que avalie a frequência destas variantes, ou a incidência referente a este grupo de doenças na população brasileira, se desconhece a contribuição que os mesmos possam ter como fatores causais de SUDI no RS. Um maior entendimento acerca dessa associação torna-se necessário para possibilitar o aconselhamento genético familiar com relação ao prognóstico de pacientes e o risco de recorrência da doença.

Considerando também que esses distúrbios são passíveis de tratamento, uma parcela das mortes precoces relacionadas podem ser referidas como evitáveis, desde que seja garantido o acesso em tempo oportuno a serviços qualificados de saúde, com diagnóstico precoce e preciso. Para tanto, estudos populacionais de prevalência, através da identificação da frequência de heterozigotos, são de fundamental importância para averiguar a importância relativa das doenças metabólicas nas situações de SUDI para a consideração do estabelecimento de ações de triagem neonatal, diagnóstico precoce e aconselhamento genético que possam colaborar na redução da morbidade e mortalidade infantil associada aos EIM no RS.

A seleção dos EIM incluídos no presente trabalho foi realizada com base nos dados disponíveis sobre a prevalência relativa dos mesmos dentro do grupo dos EIM frequentemente associados à SUDI, assim como na viabilidade metodológica para a análise das suas variantes patogênicas mais frequentes.

CAPITULO III OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar a prevalência mínima da AMMmut0, CTLNI e LCHADD em uma amostra da população saudável do Rio Grande do Sul.

3.2. Objetivos específicos

- a) Estimar a frequência das variantes c.655A>T e c.1106G>A do gene *MUT* no Rio Grande do Sul.
- b) Estimar a frequência da variante c.1168G>A do gene *ASS1* no Rio Grande do Sul.
- c) Estimar a frequência da variante c.1528G>C do gene *HADHA* no Rio Grande do Sul.

CAPÍTULO IV ARTIGO

4 ARTIGO

Título do manuscrito: Prevalence of the most common pathogenic variants in three genes for inborn errors of metabolism associated with sudden unexpected infant in infancy: a population-based study in Southern Brazil.

Autores: Dévora Natalia Randon, Fernanda Hendges de Bitencourt, Fernanda Sperb-Ludwig, Fernanda Sales Luiz Vianna, Ana Paula Pizzio Becker, Carmen Regla Vargas, Angela Sitta, Alexia Nedel Sant'Ana, Ida Vanessa Doederlein Schwartz.

Situação: Submetido.

Revista: Journal of Inherited Metabolic Diseases Reports.

Prevalence of the most common pathogenic variants in three genes for inborn errors of metabolism associated with sudden unexpected infant in infancy: a population-based study in Southern Brazil

Randon DN^{1,2}, de Bitencourt FH³, Sperb-Ludwig F^{1,2}, Vianna FSL^{1,4}, Becker APP⁵, Carmen Vargas⁶, Angela Sitta⁷, Sant'Ana AN⁸, Schwartz IVD^{1,2,7,9}

1 Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.

2 Laboratory of Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences (BRAIN), Experimental Research Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, Brazil.

3 National Institute of Science and Technology for Population Medical Genetics (INAGEMP), Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, Brazil.

4 Research Laboratory for Bioethics and Ethics in Science (LAPEBEC), Experimental Research Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, Brazil.

5 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, School of Medicine. Porto Alegre, Brazil.

6 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, School of Pharmacy. Porto Alegre, Brazil.

7 Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, Brazil.

8 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Department of Biosciences. Porto Alegre, Brazil.

9 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Department of Genetics. Porto Alegre, Brazil.

Corresponding/pre-publication author:

Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Medical Genetics Service – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS 90035-003 – Brazil

E-mail: ischwartz@hcpa.edu.br

Word count: 1775 / **Abstract word count:** 250

Number of tables: 3

ABSTRACT: Citrullinemia type 1 (CTLNI), long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD), and mut⁰ methylmalonic acidemia (mut⁰ MMA) are inborn errors of metabolism (IEMs) that have been frequently associated with sudden unexpected death in infancy (SUDI). The main pathogenic variants associated with these conditions are: 1168G>A (CTLNI, *ASS1* gene), c.1528G>C (LCHADD, *HADHA* gene), c.655A>T and c.1106G>A (mut⁰ MMA, *MUT* gene). Considering the absence of estimates regarding the incidence of these diseases in Brazil, this study sought to investigate the prevalence of its most common pathogenic variants in a healthy population in the Southern region of the country. A total of 1,000 healthy subjects (mean age: 36.6±12.1 years; 50.4% male) were recruited from the Blood Bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Genotyping was performed by real-time PCR. Individuals found to be heterozygous for the *HADHA* variant underwent further acylcarnitine profile analysis by tandem mass spectrophotometry. Allele and genotype frequencies were calculated considering Hardy-Weinberg equilibrium. The c.1528G>C variant was detected in heterozygosity in 2 subjects (carrier frequency = 1:500; allele frequency = 0.001; minimum prevalence of LCHADD = 1: 1,000,000), whose acylcarnitine profiles were normal. Variants c.1168G>A, c.655A>T, and c.1106G>A were not found. The resulting data is thought to denote the rarity of these IEMs in Southern Brazil. However, factors such as sample size and the allele heterogeneity associated with these disorders should be taken into account. This study highlights the need to expand research into IEMs as a cause of infant morbidity and mortality in the country.

Synopsis: In Southern Brazil the prevalence of the most frequent pathogenic variants in the genes *ASS1*, *HADHA*, *MUT*, and its associated EIMs, is low.

Author contributions:

- Dévora Natalia Randon: Study design, sample collection, data collection, sample processing, interpretation of results, manuscript writing.
- Fernanda Hendges de Bitencourt: Study design, sample collection, data collection, sample processing, critical appraisal of manuscript content.
- Fernanda Sperb-Ludwig: Study design, data interpretation, critical appraisal of manuscript content.
- Fernanda Sales Luiz Vianna: Study design, critical appraisal of manuscript content.
- Ana Paula Pizzio Becker: Sample and data collection, critical appraisal of manuscript content.
- Carmen Vargas: Sample processing, critical appraisal of manuscript content.
- Angela Sitta: Sample processing, critical appraisal of manuscript content.
- Alexia Nedel Sant'Ana: Sample and data collection, sample processing, critical appraisal of manuscript content.
- Ida Vanessa Doederlein Schwartz: Study conception and design, data interpretation, critical appraisal of manuscript content, final approval.

Corresponding/pre-publication author: Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Conflicts of interest: The authors report no conflicts of interest.

Funding: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM-UFRGS); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/MS/CNPQ/SESRS call for papers PPSUS - 03/2017).

The authors confirm independence from the sponsors and the content of the article has not been influenced by the sponsors.

Ethical approval: This study was approved by the HCPA Research Ethics Committee (number 17-0249) - *Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA*.

Keywords: Sudden unexpected death in infancy, inborn errors of metabolism, citrullinemia type I, long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency, mut⁰ methylmalonic acidemia, pathogenic variants, prevalence.

INTRODUCTION

Sudden unexpected death in infancy (SUDI) refers to the death of a child that occurs suddenly and unexpectedly during the first year of life, and represents one of the leading causes of post-neonatal death¹. Inborn errors of metabolism (IEMs) are estimated to account for 0.9% to 6% of such events^{2,3}. Within the IEMs known to be associated with SUDI, citrullinemia type 1 (CTLNI; MIM #215700), long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD; MIM #609016), and mut⁰ methylmalonic acidemia (mut⁰ MMA; #MIM 25100), among other autosomal recessive IEMs, are treatable and identifiable by neonatal screening⁴.

CTLNI is a urea cycle disorder caused by deficiency of the enzyme argininosuccinate synthetase (ASS, EC 6.3.4.5) due to pathogenic variants in the *ASS1* gene⁵. Among these, c.1168G>A (p.Gly390Arg), in exon 15, accounts for up to 62% of alleles in European patients diagnosed with the disorder⁶. LCHADD, a disorder of fatty-acid beta-oxidation, is caused by pathogenic variants in the *HADHA* gene, which encodes the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein (MTP; EC 1.1.1.211)⁷. Variant c.1528G>C (p.Glu510Gln), in exon 15, is observed in 87–91% of European patients with clinically overt disease⁸. Certain variants in the *MUT* gene, which codes for the enzyme methylmalonyl-CoA mutase (MUT; EC 5.4.99.2), are the cause of mut⁰ MMA⁹, a disorder of propionate catabolism. The most frequent implicated variants are c.655A>T (p.Asn219Tyr) in exon 3 and

c.1106G>A (p.Arg369His) in exon 6, representing approximately 25%¹⁰ and 10%¹¹ of alleles in European patients, respectively.

Considering that the aforementioned IEMs are not included in the Brazilian nationwide neonatal screening program and that there are no estimates regarding their incidence in the country, this study was designed to investigate the presence of the most prevalent pathogenic variants associated with these conditions in a healthy population in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

This was an observational, cross-sectional study with a convenience sampling strategy. The study protocol was approved by the local Research Ethics Committee, in accordance with Brazilian regulations for human subject research, and all participants provided written informed consent.

1. Study sample

The sample size was estimated at 980 individuals. Calculation was performed in WINPEPI (PEPI-for-Windows, version 11.65), using as a parameter the known proportion of heterozygotes for variant c.1528G>C in various European populations^{8,12–16}. An error rate of 0.3%, statistical power of 80%, alpha = 0.05, and 95% confidence interval (95%CI) were used.

The study sample consisted of 1,000 voluntary blood donors, with a mean age of 36.6 ± 12.1 years (range 19–69 years). Participants were recruited from the Blood Bank at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, a tertiary teaching hospital affiliated with Universidade Federal do Rio Grande do Sul, between August 2017 and March 2019.

Each participant completed a form designed to collect data on date and place of birth, ancestry (European or non-European), family consanguinity and family history of SUDI.

2. Biological sample and genotyping

From each participant, a 5 mL sample of peripheral blood was collected into an EDTA-containing tube and stored at -20 °C. Genomic DNA was extracted with the commercially available Easy-DNA™ Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer-provided protocol.

Genomic DNA was analyzed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with TaqMan™ genotyping (Thermo Fisher) in StepOne™ and QuantStudio 3™ systems (Thermo Fisher), performed in accordance with the manufacturer's instructions. Custom TaqMan genotyping assays were ordered from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), based on the reference sequences NG_011542.1 (*ASS1*), NG_007121.1 (*HADHA*), and NG_007100.1 (*MUT*).

3. Biochemical analysis

Individuals heterozygous for the c.1528G>C variant (*HADHA*) also underwent acylcarnitine profile analysis by tandem mass spectrometry (MS/MS) of blood samples collected on filter paper, based on the protocol established by Rashed et al¹⁷.

4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed in SPSS Version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The carrier frequency was obtained by calculating the ratio of heterozygous individuals to the total number of individuals analyzed, and reported with a 95%CI.

Gene and genotype frequencies were calculated assuming Hardy-Weinberg equilibrium in the population.

RESULTS

The characteristics of the study sample are shown in Table 1.

Two subjects (0.2%) were found to be heterozygous for the c.1528G>C (*HADHA*) variant, which corresponds to a carrier frequency of 1:500 (95%CI 0.1–3.6). The gene frequencies for alleles c.1528G and c.1528C were 0.999 and 0.001, respectively. The estimated minimum prevalence for LCHADD as a consequence of the c.1528C allele in Rio Grande do Sul was 1:1,000,000. The acylcarnitine profiles of both individuals heterozygous for c.1528G>C were normal (Table 2).

Variants c.1168G>A (*ASS1*), c.655A>T and c.1106T>A (*MUT*) were not found in the analyzed sample.

DISCUSSION

The Brazilian population is one of the most ethnically heterogeneous of the world, as the result of five centuries of miscegenation among indigenous, European, and African populations; in the South region, European ancestry predominates¹⁸, as our data corroborate (Table 1). This predominance of European ancestry might suggest that the prevalence of the variants of interest in the population of Rio Grande do Sul would be similar to that reported in European countries.

Familial consanguinity, defined as any degree of kinship (not only between parents), was reported by 11.7% of the individuals enrolled. Despite the potentially subjective nature of this type of information, this finding could be associated to a high frequency

of IEMs in the region, as both the IEMs included in the present study and the majority of those associated with SUDI present an autosomal recessive inheritance pattern, with a recurrence rate of 25% in affected families⁴.

The infant mortality rate by SUDI in Brazil overall and in Rio Grande do Sul is 47:10,000 (1:213) and 45:10,000 (1:222) live births, respectively¹⁹. However, in this study 8.8% of the participants reported a case of sudden death of children under age 1 year in the family, which results in a proportion of 1:11 individuals. Although this is an indirect finding, and the death certificates of these children were not sought for confirmation, this could suggest a higher frequency of SUDI, compared to both national and regional estimates.

Regarding the variants analyzed in this study, the absence of the c.1168A allele (*ASS1*) could be indicating its rarity in the region, in agreement with the information available in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) and in the Genome Aggregation Database (gnomAD), which show a frequency of ~0.0003, both for European and global populations. However, these databases do not include information about Brazilian individuals. The Brazilian Online Archive of Mutations (ABraOM), which catalogs exon variants from 609 healthy elderly from the city of São Paulo, in Southeast Brazil, interestingly shows a slightly higher frequency of 0.0016.

The prevalence of c.1168A was previously described for USA and Argentine populations (Table 3). In the USA., Bardos and colleagues determined a carrier frequency of 1:383 and a prevalence of 1:575,000²⁰, contradicting the estimated overall incidence of CTLNI (~1:250,000)²¹. In comparison, in the city of Villa

Mercedes, Argentina, Laróvere and colleagues. reported a carrier frequency of 1:25 and a prevalence of 1:2,427. Additionally, the authors determined a CTLNI occurrence of 57% for the offspring of couples consisting of two heterozygous individuals, a much higher frequency than expected for autosomal recessive disorders, which suggests a preferential transmission of the c.1168A allele²². This highlights the relevance of this pathogenic variant in relation to early diagnosis and genetic counseling for populations at risk.

Our data suggest a low prevalence of CTLNI in Rio Grande do Sul; however, the allele heterogeneity related to the *ASS1* gene must be taken into account. Furthermore, the absence of the c.1168A allele may have been due to the sample size of our study.

The allele frequency estimated in this study for the variant c.1528G>C (*HADHA*) is in agreement with ExAC and gnomAD data, which show a frequency of 0.0012 for the global population and 0.0016 for Europe (non-Finnish). In São Paulo, the frequency is also 0.0016 (ABraOM). The prevalence of this allele has been described in several populations (Table 3). We found a carrier frequency of 1:500, which exceeds the estimated frequency for the Netherlands (1:680)¹³, but is lower than reported for other European populations. The highest frequency was observed in northern Poland, with a probable founder effect in the population of Kashubia^{8,15}. In comparison, the allele was absent in all 1,200 individuals analyzed in a study in Beijing²³. Based on the frequency of c.1528G>C, the birth prevalence of LCHADD is predicted to be 1:118,336 in Poland and 1:91,700 in Estonia^{15,16}. Our findings suggests that the minimum prevalence of LCHADD in Rio Grande do Sul would be 1:1,000,000. According to data from neonatal MS/MS screening programs, the

prevalence of this condition ranges from 1:176,000 in Germany to 1:840,000 in Japan²⁴. It should be noted that MS/MS cannot distinguish between general mitochondrial trifunctional protein deficiency (MIM #609015) and LCHADD. The size of the study sample and allele heterogeneity should also be considered when interpreting the estimates of the present study.

The c.655A>T variant (*MUT*) presents an allele frequency of ~0.00005 in the global population, according to ExAC and gnomAD data, being found only in non-Finnish European populations and Ashkenazi Jews. Likewise, the overall frequency of c.1106G>A (*MUT*) is reported as ~0.00004 in ExAC and ~0.00006 in gnomAD. In non-Finnish European populations, it is ~0.00004 in ExAC and ~0.00007 in gnomAD. Both variants are absent from the ABraOM database. According to USA neonatal screening data, the prevalence of mut⁰ MMA is ~1:100,000²⁵. The absence of these alleles in the sample analyzed herein, as well as their low frequency in relation to the estimated incidence of mut⁰ MMA, could be a result of the allele heterogeneity associated with this disorder. To the best of our knowledge, there are as yet no other estimates for the frequency of these variants in healthy populations.

CONCLUSIONS

This was the first study to evaluate the prevalence of the most frequent pathogenic variants in the genes implicated in CTLNI, LCHADD, and mut⁰ MMA—three inborn errors of metabolism associated with SUDI—in a healthy population, specifically in Southern Brazil. The low estimated prevalence of the variants is thought to denote the rarity of these disorders in Rio Grande do Sul. However, one must take into account the possible influence of the sample size, as well as the allele heterogeneity

associated with the *ASS1*, *HADHA*, and *MUT* genes. Despite the preponderance of European ancestry in the Southern region of Brazil, other pathogenic variants may occur with a frequency higher than that established for other geographical areas currently covered in the literature. The findings of this study are particularly relevant in the context of early diagnosis and genetic counseling, and underscore the need to expand IEMs investigation in relation to infant morbidity and mortality within the territory.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the staff at the Hospital de Clínicas of Porto Alegre Blood Bank, especially Dr. Léo Sekine, head of the Hemotherapy Service. We are grateful to Bruna Bento, Guilherme M Pagel, Júlia L Deimling, Luiz F Portela, Marco AB Kalil, Mariana L dos Santos, Mariana Scortegagna and Vaneisse CL Monteiro, who contributed to the sample and data collection. This work was supported by: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGBM-UFRGS); and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/MS/CNPQ/SESRS call for papers PPSUS - 03/2017).

TABLES

Table 1. Characteristics of the study sample (N=1,000)

Variable	N (%)
<i>Sex</i>	
Male	504 (50.4%)
Female	496 (49.6%)
<i>Birthplace</i>	
-Rio Grande do Sul	922 (92.2%)
Porto Alegre	470 (47.0%)
Other municipalities	452 (45.2%)
-Other states	75 (7.5%)
-Other countries	3 (0.3%)
<i>Ancestry</i>	
-European	639 (63.9%)
German	272 (27.2%)
Italian	202 (20.2%)
Portuguese	110 (11.0%)
Other European	55 (5.5%)
-No European ancestry	252 (25.2%)
-Unknown	109 (10.9%)
<i>Familial consanguinity</i>	
Yes	117 (11.7%)
No	808 (80.8%)
Unknown	75 (7.5%)
<i>Family history of SUDI</i>	
Yes	88 (8.8%)
No	849 (84.9%)
Unknown	63 (6.3%)

Table 2. Characteristics of individuals heterozygous for variant c.1528G>C (*HADHA*).

Subject	Sex	Age (years)	Birthplace	European ancestry	Familial consanguinity	Family history of SUDI
#464	Female	52	Porto Alegre	Yes	Yes	No
#513	Female	29	Porto Alegre	No	No	No

Table 3. Carrier frequency of the c.1168G>A (*ASS1*) and c.1528G>C (*HADHA*) variants in different populations.

Variant	Population	Number of heterozygotes/Number of individuals analyzed	Frequency of heterozygosity	References
c.1168G>A	Argentina	7/172	1:25	22
	Brazil	0/1000	0	This study
	United States	29/11132	1:383	20
c.1528G>C	Brazil	2/1000	1:500	This study
	China	0/1200	0	23
	Estonia	6/1040	1:173	16
	Finland	5/1200	1:240	12
	Finland	9/1637	1:181	14
	Finland (North)	1/365	1:365	14
	Finland (South)	3/492	1:164	14
	Finland (East)	2/385	1:193	14
	Finland (West)	3/392	1:132	14
	Netherlands	3/2047	1:680	13
	Poland (children)	22/4137	1:189	15
	Poland (adults)	36/5877	1:163	8
	Poland (Pomerania, children)	41/2976	1:73	15
	Poland (Pomerania, adults)	4/413	1:103	8
	Poland (Kashubia, adults)	18/1023	1:57	8

REFERENCES

1. Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, et al. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics*. 2004;114:234–8.
2. Boles RG, Buck EA, Blitzler MG, et al. Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden death in the first year of life. *J Pediatr*. 1998;132:924–933.
3. Chace DH, DiPerna JC, Mitchell BL, et al. Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death. *Clin Chem*. 2001;47:1166–1182.
4. van Rijt WJ, Koolhaas GD, Bekhof J, et al. Inborn Errors of Metabolism That Cause Sudden Infant Death: A Systematic Review with Implications for Population Neonatal Screening Programmes. *Neonatology*. 2016;109:297–302.
5. Beaudet AL, O'Brien WE, Bock HG, et al. The human argininosuccinate synthetase locus and citrullinemia. *Adv Hum Genet*. 1986;15:161–96,291–2.
6. Diez-Fernandez C, Rüfenacht V, Häberle J. Mutations in the Human Argininosuccinate Synthetase (ASS1) Gene, Impact on Patients, Common Changes, and Structural Considerations. *Hum Mutat*. 2017;38:471–484. Epub ahead of print. DOI: 10.1002/humu.23184.
7. IJlst L, Wanders RJA, Ushikubo S, et al. Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the α -subunit of the mitochondrial trifunctional protein. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab*. 1994;1215:347–350.
8. Nedoszytko B, Siemińska A, Strapagiel D, et al. High prevalence of carriers of variant c.1528G>C of HADHA gene causing long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD) in the population of adult Kashubians from North Poland. *PLoS One*. 2017;12:e0187365.
9. Ledley FD, Lumetta MR, Zoghbi HY, et al. Mapping of human methylmalonyl CoA mutase (MUT) locus on chromosome 6. *Am J Hum Genet*. 1988;42:839–46.
10. Acquaviva C, Benoist J-F, Pereira S, et al. Molecular basis of methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by mut^o and mut- forms of methylmalonic acidemia: Identification of 29 novel mutations in the MUT gene. *Hum Mutat*. 2005;25:167–176.

11. Forny P, Schnellmann A, Buerer C, et al. Molecular Genetic Characterization of 151 Mut -Type Methylmalonic Aciduria Patients and Identification of 41 Novel Mutations in MUT. *Hum Mutat.* 2016;37:745–754.
12. Tyni T, Pihko H. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatr.* 1999;88:237–45.
13. Den Boer MEJ, Ijlst L, Wijburg FA, et al. Heterozygosity for the common LCHAD mutation (1528G>C) is not a major cause of HELLP syndrome and the prevalence of the mutation in the dutch population is low. *Pediatr Res.* 2000;48:151–154.
14. Pastinen T, Perola M, Ignatius J, et al. Dissecting a population genome for targeted screening of disease mutations. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2961–2972.
15. Piekutowska-Abramczuk D, Olsen RKJ, Wierzba J, et al. A comprehensive HADHA c.1528G>C frequency study reveals high prevalence of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency in Poland. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33:373–377.
16. Joost K, Ounap K, Zordania R, et al. Prevalence of Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Estonia. *JIMD Rep.* 2012;2:79–85.
17. Rashed MS, Bucknall MP, Little D, et al. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. *Clin Chem.* 1997;43:1129–41.
18. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:177–82.
19. de Bitencourt FH. Morte súbita e inesperada na infância associada a erros inatos do metabolismo no Brasil : uma abordagem epidemiológica genética (Doctoral dissertation). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 2018. Retrieved from <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/193656/001075633.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
20. Bardos J. Carrier Rate of Citrullinemia, Type I in Individual Ethnic Groups Using an Expanded Carrier Test. *World J Gynecol Womens Heal.* 2019;2:2–3.
21. Summar ML, Koelker S, Freedenberg D, et al. The incidence of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab.* 2013;110:179–180.

22. Laróvere LE, Ruiz SMS, Angaroni CJ, et al. Molecular epidemiology of citrullinemia type I in a risk region of Argentina: a first step to preconception heterozygote detection. *JIMD Rep.* 2012;6:27–9.
23. Zhu JM, Yang Z, Yu M, et al. [Screening for the G1528C mutation in long chain fatty acid oxidation enzyme in Han nationality in Beijing population]. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2005;37:72-74.
24. Shibata N, Hasegawa Y, Yamada K, et al. Diversity in the incidence and spectrum of organic acidemias, fatty acid oxidation disorders, and amino acid disorders in Asian countries: Selective screening vs. expanded newborn screening. *Mol Genet Metab Rep.* 2018;16:5–10.
25. Feuchtbaum L, Carter J, Dowray S, et al. Birth prevalence of disorders detectable through newborn screening by race / ethnicity. *Genet Med.* 2012;14:937–945. Epub ahead of print. DOI: 10.1038/gim.2012.76.

CAPÍTULO V DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O perfil de mortalidade infantil pode ser considerado um indicador relativamente sensível da qualidade de vida da população e os cuidados de saúde dispensando às crianças menores de um ano de idade (Volpe et al., 2009). Apesar do Brasil e o RS terem apresentado em 2015 as menores taxas de mortalidade infantil desde a década de 70, com valores de 13,82:1.000 (1:72) e 10,1:1000 (1:99) nascidos vivos, respectivamente, as mesmas ainda superam notavelmente àquelas de países desenvolvidos como Noruega, Suécia, França e Itália, os quais apresentam valores de 2,48; 2,70; 3,28 e 3,29:1.000 nascidos vivos, respectivamente (ODM Brasil, 2016; IBGE, 2015). A SUDI representa uma fração substancial da mortalidade infantil no país, sendo que somente os casos de SIDS ranquearam na 19ª posição para esses tipos de óbitos em 2015. No mesmo ano, a primeira causa de óbito infantil na maior parte do país, incluindo o RS foram as anomalias congênitas, categoria na qual estão incluídos os EIM (França et al., 2017).

A primeira referência à associação entre um distúrbio metabólico - hiperplasia congênita da supra-renal - e SUDI foi estabelecida por Cleveland e colaboradores no ano de 1962. Porém, somente a partir de meados dos anos 80 ampliaram-se os estudos relacionados à associação entre EIM e SUDI (Bennett et al., 1986; Bonham e Downing, 1992), focando predominantemente nos FAOD, os quais seriam responsáveis por cerca de 5% dos casos de SUDI (Wilcox et al., 2002; Yamamoto et al., 2015). Subsequentemente, outros EIM, incluindo acidemias orgânicas, aminoacidopatias e alterações da cadeia respiratória, foram estabelecidos como fatores causais de SUDI (Moore et al., 2000; Loughrey et al., 2005). Atualmente, estima-se que ao menos 32 EIM estão associados à SUDI, sendo que a maioria é passível de alguma forma de tratamento (van Rijt et al., 2016). No entanto, a literatura referente à mortalidade infantil decorrente de EIM associados à SUDI é limitada e pouco se sabe sobre essa associação no país e no RS. Bitencourt e colaboradores (2019) determinaram que a taxa de mortalidade infantil atribuível a esse conjunto de EIM para o Brasil, no período de 2002-2014, foi de 0,67:10.000 (1:14.925) nascidos vivos, valor que estaria refletindo a raridade, subnotificação ou subdiagnóstico destas condições.

A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo, como resultado de 5 séculos de miscigenação entre populações indígenas, europeias e africanas. Moura e colaboradores relatam que o sul do Brasil é composto por 77% de ancestralidade europeia, dado este que corrobora com outros achados da literatura e com o presente trabalho (Parra et al., 2003; Moura et al., 2015). Conseqüentemente, os dados resultantes deste trabalho não deveriam ser extrapolados diretamente para outras regiões do país. Também, essa predominância de ancestralidade europeia poderia sugerir para o RS, a princípio, uma prevalência das variantes aqui analisadas semelhante àquela reportada em populações da Europa.

Conforme o último censo demográfico, o RS compreende mais de 10.693.929 habitantes, dos quais 1.409.351 (13%) residem na capital, Porto Alegre (IBGE, 2010), a qual é caracterizada por um importante histórico de imigração açoriana (Laytano, 1974; Carneiro, 1992). As migrações internas constituem um movimento social de grande importância no estado, sendo Porto Alegre e toda a Região Grande Metropolitana os principais polos de concentração de migrantes, principalmente na faixa produtiva jovem (25 a 29 anos), apontando a atração propiciada pelo estudo e o dinamismo econômico (Leal et al., 1985; Jardim e Barcellos, 2012). Apesar da maioria dos indivíduos incluídos neste trabalho serem oriundos de Porto Alegre, indivíduos de outros 135 municípios também foram avaliados, o que contribui para uma maior representatividade do estado em geral.

O percentual de consanguinidade na família relatado pelos indivíduos incluídos no estudo, de 11,7%, referindo-se a qualquer grau de parentesco e não somente entre pais, é superior às estimativas de consanguinidade estabelecidas para o Brasil e para o RS, com valores de 1-4% (Bittles e Black, 2010) e 1.6% (Liascovich et al., 2001), respectivamente. Apesar da potencial subjetividade desse tipo de informação, esse dado poderia estar relacionado a um maior risco e prevalência de EIM na região, pois tanto os EIM incluídos no presente trabalho, quanto a maioria dos que estão associados à SUDI, apresentam padrão de herança autossômico recessivo, com uma taxa de recorrência para famílias afetadas de 25%.

No período de 2002-2014, a taxa de mortalidade infantil por SUDI no Brasil e no RS foi de 47:10.000 (1:213) e 45:10.000 (1:222) nascidos vivos, respectivamente (Bitencourt, 2018). Entretanto, 8,8% (n=88) dos indivíduos aqui avaliados relataram algum caso de morte súbita de crianças menores de um ano de idade na família, o que representa uma proporção de 1:11 indivíduos. Apesar de ser um dado indireto, e de não se ter acesso às declarações de óbitos dessas crianças e/ou acesso ao diagnóstico formal, a proporção relatada supera consideravelmente os valores estabelecidos a nível nacional e regional.

Até o momento, apenas 2 estudos brasileiros avaliaram a prevalência da variante patogênica mais frequente para um gene um associado à SUDI: o gene *ACADM*, responsável pela deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCADD). Esses estudos foram realizados no sul e sudeste do país, encontrando frequências inferiores àquelas estimadas para populações europeias (Netto, 1997; Ferreira et al., 2009).

Com relação às variantes analisadas no presente trabalho, a ausência dos alelos c.655T e c.1106A no gene *MUT* estaria indicando a raridade dos mesmos no RS, em concordância com a informação disponível no Exome Aggregation Consortium (ExAC) e The Genome Aggregation Database (gnomAD), que mostram para a variante c.655C>T uma frequência gênica de ~0,00005 na população global, sendo observada apenas em populações da Europa (excluindo a Finlândia) e judeus Ashkenazi. De forma similar, a frequência global de c.1106G>A é de ~0,00004 (ExAC) e ~0,00006 (gnomAD), enquanto que para a Europa (excluindo a Finlândia) é de ~0,00004 (ExAC) e ~0,00007 (gnomAD). No entanto, essas bases de dados não incluem informação sobre indivíduos brasileiros. O Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM), por outro lado, compreende variantes exônicas de 609 idosos saudáveis da cidade de São Paulo, no sudeste do Brasil, sendo que ambos alelos não estão representados em referida população.

Nossos dados estariam apontando uma baixa prevalência de AMMmut⁰ na região, sendo necessário considerar também o tamanho amostral utilizado. Deve-se ressaltar que a ausência desses alelos na população aqui analisada, assim como sua baixa frequência em relação à incidência estimada da AMMmut⁰, poderia

ser consequência da heterogeneidade alélica relacionada a esta condição. Os dados referentes à prevalência da AMMmut⁰ são limitados, e não existem até o momento outras estimativas para a frequência das variantes c.655C>T e c.1106G>A em uma população saudável.

Em relação ao gene *ASS1*, a variante c.1168G>A apresenta uma frequência de ~0,0003, tanto na população global como na população europeia (excluindo a Finlândia), segundo dados do ExAC e gnomAD. Interessantemente, os dados do ABraOM mostram uma frequência ligeiramente mais elevada, de 0,0016.

Nossos dados sugerem uma baixa prevalência para a CTLNI na região, relacionada a este alelo em particular. A prevalência desta condição foi estimada para algumas populações, com base em diversos programas de triagem neonatal. A maior frequência foi observada na Alemanha, com um valor de 1:60.000 (Gramer et al., 2018). Shibata e colaboradores (2018) estimaram para a Coreia e o Japão uma prevalência de 1:115.000 e 1:306.000, respectivamente, enquanto que para Taiwan, os mesmos determinaram um valor de 1:199.000, em consonância com os resultados de Niu e colaboradores (2010), que apontam uma magnitude ligeiramente superior, de 1:118.543.

Apesar do fato dessa variante ser a mais comum em várias populações, existe a possibilidade de que no RS outros sejam os alelos mais prevalentes associados à CTLNI. No entanto, a ausência desta variante também pode ser decorrente do tamanho amostral utilizado no presente trabalho.

A prevalência do alelo c.1168A foi descrita anteriormente para populações dos EUA e Argentina. Em um estudo retrospectivo de 11.132 indivíduos dos EUA, Bardos e colaboradores (2019) determinaram uma frequência de heterozigotos de 1:383, com uma prevalência de 1:575.000, contrastando com as estimativas disponíveis até o momento. Ao considerar individualmente os grupos étnicos da população analisada, os autores determinaram uma proporção de heterozigotos de 1:422, 1:392 e 1:124 para indivíduos caucasoides, hispânicos e judeus Ashkenazi, respectivamente. Por outro lado, o alelo não foi encontrado em indivíduos afro-americanos (n=785), asiáticos (n=1.091), nativos americanos (n=16) e judeus Sefarditas (n=58). Em comparação, na cidade de Villa Mercedes, Argentina,

Laróvere e colaboradores (2012) estimaram, a partir de uma amostra de apenas 172 indivíduos hígidos, uma frequência de heterozigotos 1:25, com uma correspondente prevalência de 1:2.427. Adicionalmente, os autores determinaram uma ocorrência de CTLNI de 57% em filhos de casais compostos por ambos progenitores heterozigotos para a variante em questão. Esta frequência duplica à esperada para distúrbios autossômicos recessivos, sugerindo uma transmissão preferencial do alelo c.1168A (Laróvere et al., 2012). Este fenômeno foi descrito anteriormente por Kleijer e colaboradores (2006), os quais sugeriram um papel protetor do alelo patogênico contra o possível efeito prejudicial ou apoptótico do óxido nítrico (NO) nas gametas haploides masculinas. O NO é produzido normalmente a partir da L-arginina pela ação das enzimas óxido nítrico sintetases, no entanto, devido à depleção da enzima ASS nas células portadoras do alelo patogênico, a arginina não pode ser reciclada a partir da citrulina, resultando em uma menor concentração de NO (Morris, 2004; Rodriguez et al., 2005). Este fato salienta a relevância da variante c.1168G>A em relação tanto ao diagnóstico precoce como ao aconselhamento genético para a CTLNI em populações em risco.

Por outro lado, a frequência gênica estimada no presente trabalho para a variante c.1528G>C (*HADHA*) está em concordância com os dados exibidos no ExAC e gnomAD, os quais mostram valores de ~0,0012 e ~0,0016 para a população global e para a Europa (excluindo a Finlândia), respectivamente. Em São Paulo a frequência também é de 0,0016 (ABraOM).

A proporção de heterozigotos determinada para o alelo c.1528C no RS (1:500) supera o valor de 1:680 estimado para a Holanda por den Boer e colaboradores (2000), a partir de uma amostra de 2.047 indivíduos, no entanto, é inferior ao relatado para as outras populações europeias que foram avaliadas até o momento. Na Polônia, Piekutowska-Abramczuk e colaboradores (2010) determinaram a partir de uma amostra de 4.137 crianças uma frequência de 1:189, em consonância com os resultados de Nedoszytko e colaboradores (2017), os quais mostram uma proporção de 1:163 (n=5.877 adultos). A maior frequência foi observada na região da Pomerânia, com um valor de 1:103 (n=413 adultos), provavelmente em decorrência de um efeito fundador na população Kashubiana, na qual encontrou-se uma frequência de 1:57 a partir da análise de 1.023 adultos (Nedoszytko et al.,

2017). Cabe destacar que a região Pomerânia teve um papel importante na colonização do sul do RS, na segunda metade do século XIX, principalmente na região correspondente aos atuais municípios de São Lourenço do Sul, Pelotas, Santa Cruz do Sul e São Leopoldo (Salamoni, 2001). A população analisada no presente trabalho inclui apenas 55 indivíduos (5,5%) oriundos de tais municípios. O alelo c.1528C também exibe uma elevada frequência na Finlândia, com uma proporção de heterozigotos de 1:181 (n=1.1637 indivíduos), principalmente na região oeste, com um valor de 1:132 (n=392 indivíduos), conforme Pastinen e colaboradores (2001). De maneira similar, na Estônia Joost e colaboradores estimaram uma frequência de 1:173 (n=1.040 indivíduos). Em comparação, esta variante não foi encontrada nos 1.200 indivíduos analisados em Beijing (Zhu et al., 2005).

Nossos dados apontam para a LCHADD uma prevalência mínima de 1:1.000.000, um valor consideravelmente inferior às estimativas disponíveis tanto para a população mundial como para diferentes populações específicas. Com uma prevalência de 1:50.000, esta condição foi descrita como o FAOD mais frequente na Suécia (Hagenfeldt et al., 1995). Na Estônia, a prevalência foi estimada em 1:91.700 (Joost et al., 2012), enquanto que para a Polônia, Piekutowska-Abramczuk e colaboradores (2010) estabeleceram um valor de 1:118.336, sendo de 1:16.900 na região Pomerânia. Com base nos dados de programas de triagem neonatal, obtidos através de MS/MS, a prevalência da LCHADD foi estimada em 1:116.129 em Portugal (Rocha et al., 2014), 1:176.000 na Alemanha (Gramer et al., 2018), 1:640.707 na Itália (Rocha et al., 2014), e 1:840.000 no Japão (Shibata et al., 2018). No entanto, o valor estimado no presente trabalho supera a prevalência de 1:1.148.000 estabelecida para a Coreia, conforme o trabalho de Shibata e colaboradores (2018). Cabe ressaltar que a metodologia de MS/MS não permite distinguir entre a LCHADD e a deficiência geral da proteína trifuncional (Sander et al., 2005) e, portanto, a frequência desta condição poderia estar sendo superestimada. O tamanho da população de estudo e a heterogeneidade alélica, também devem ser considerados em relação às estimativas do presente estudo.

Considerando a patogenicidade da variante c.1528G>C, nós avaliamos os perfis de acilcarnitinas dos 2 indivíduos identificados como heterozigotos para este

alelo, os quais sugerem que os mesmos não portam alguma outra variante patogênica associada à LCHADD no gene *HADHA*, ao menos em configuração *trans*. Dentre eles, somente um indivíduo alega ter ancestralidade europeia, especificamente italiana e portuguesa, no entanto, não existem estimativas acerca da prevalência desta variante para essas populações em particular. Ambos indivíduos serão contatados para fins de aconselhamento genético.

Levando em consideração os achados resultantes deste trabalho, pretendemos ampliar a análise genética com o intuito de estimar a prevalência das variantes patogênicas mais frequentes para outros 7 EIM associados à SUDI e não incluídos no PNTN: deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCADD), acidemia glutárica tipo I (GAI), deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (VLCADD), glicogenose tipo Ia (GSDIa), glicogenose tipo Ib (GSDIb), glicogenose tipo II (GSD II) e tirosinemia tipo I. Os resultados da ampliação do estudo possibilitarão estimar a frequência dos EIM estudados na população do RS, permitindo-se assim, uma avaliação mais abrangente do panorama da morbimortalidade infantil decorrente dos EIM na região, visando a consideração da inclusão dessas doenças, especialmente FAOD, no PNTN.

CAPÍTULO VI CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho é o primeiro a avaliar a frequência do conjunto das principais variantes patogênicas nos genes causadores de CTLNI, LCHADD e AMMmut0 – associados à SUDI – em uma população saudável, particularmente no sul do Brasil. O estudo possibilitou estimar para a LCHADD uma prevalência mínima de 1:1.000.000 indivíduos. Os dados resultantes estariam refletindo a raridade desses distúrbios no RS ao mesmo tempo que destacam especial relevância no contexto do diagnóstico precoce e aconselhamento genético. No entanto, é necessário considerar a possível influência do tamanho amostral utilizado, assim como da heterogeneidade alélica associada aos genes *ASS1*, *HADHA* e *MUT*, visto que, apesar da preponderância europeia na região, outros alelos patogênicos poderiam apresentar uma frequência maior que a estabelecida para as áreas geográficas incluídas atualmente na literatura. A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo e o presente trabalho salienta, de maneira inédita, a necessidade de expandir a investigação de EIM em relação à morbimortalidade infantil no território.

Conclusões de acordo com os objetivos específicos

- a) Estimar a frequência das variantes c.655A>T e c.1106G>A do gene *MUT* no Rio Grande do Sul.

As variantes c.655A>T e c.1106G>A não foram encontradas no total da população analisada.

- b) Estimar a frequência da variante c.1168G>A do gene *ASS1* no Rio Grande do Sul.

A variante c.1168G>A não foi encontrada no total da população analisada.

- c) Estimar a frequência da variante c.1528G>C do gene *HADHA* no Rio Grande do Sul.

Foi possível determinar para a variante c.1528G>C uma frequência gênica de 0,001 e uma frequência de heterozigotos de 1:500.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

Acquaviva C, Benoist JF, Callebaut I, Guffon N, Ogier de Baulny H, Touati G, Aydin A, Porquet D, Elion J (2001) N219Y, a new frequent mutation among mut^o forms of methylmalonic acidemia in Caucasian patients. *Eur J Hum Genet* 9(8):577-582.

Acquaviva C, Benoist JF, Pereira S, Callebaut I, Koskas T, Porquet D, Elion J (2005) Molecular basis of methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by mut^o and mut⁻ forms of methylmalonic acidemia: Identification of 29 novel mutations in the MUT gene. *Hum Mutat* 25(2):167-176.

Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. [Internet]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/> Acesso: jan 2019.

Agana M, Frueh J, Kamboj M, Patel DR and Kanungo S (2018) Common metabolic disorder (inborn errors of metabolism) concerns in primary care practice. *Ann Transl Med* 6(4):469.

Al-Dirbashi OY, McIntosh N, Chakraborty P (2016) Quantification of 2-methylcitric acid in dried blood spots improves newborn screening for propionic and methylmalonic acidemias. *J Med Screen* 24(2):58-61.

Andermann A, Blancquaert I, Beauchamp S, Déry V (2008) Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ* 86(4):317-319.

Bardos J, Terhaar C, Echeverri N, Longman RE (2019) Carrier Rate of Citrullinemia, Type I in Individual Ethnic Groups Using an Expanded Carrier Test. *World J Gynecol Womens Heal* 2:2-3.

Beudet AL, O'Brien WE, Bock HG, Freytag SO, Su TS (1986) The human argininosuccinate synthetase locus and citrullinemia. *Adv Hum Genet* 15:161-96, 291-2.

Bennett MJ, Variend S, Pollit RJ (1986) Screenings siblings for inborn errors of fatty acid metabolism in families with history of sudden infant death. *Lancet* 1470:8521-8522.

Berning C, Bieger I, Pauli S, Vermeulen T, Vogl T, Rummel T, Höhne W, Koch HG, Rolinski B, Gempel K et al. (2008) Investigation of citrullinemia type I variants by in vitro expression studies. *Hum Mutat* 29(10):1222-1227.

Bhagavan NV (2002) Fatty acids and eicosanoids. In: *Medical Biochemistry*. 4th edition, Harcourt/Academic Press San Diego, pp 366-398.

Bijarnia-Mahay S, Häberle J, Jalan AB, Puri RD, Kohli S, Kudalkar K, Rüfenacht V, Gupta D, Maurya D, Verma J et al. (2018) Urea cycle disorders in India: clinical course, biochemical and genetic investigations, and prenatal testing. *Orphanet J Rare Dis* 13:174.

Bitencourt FH (2018) Morte súbita e inesperada na infância associada a erros inatos do metabolismo no Brasil: uma abordagem epidemiológica e genética. Tese

(Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Bitencourt FH, Schwartz IVD, Vianna FSL (2019) Infant mortality in Brazil attributable to inborn errors of metabolism associated with sudden death: a time-series study (2002–2014). *BMC Pediatr* 19:52.

Bittles AH e Black ML (2010) Consanguinity, human evolution, and complex diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 7: 1779-1786.

Blair NF, Cremer PD, Tchan MC (2014) Urea cycle disorders: a life-threatening yet treatable cause of metabolic encephalopathy in adults. *Pract Neurol* 15:45-48.

Bo R, Yamada K, Kobayashi H, Jamiyan P, Hasegawa Y, Taketani T, Fukuda S, Hata I, Niida Y, Shigematsu Y et al. (2017) Clinical and molecular investigation of 14 Japanese patients with complete TFP deficiency: a comparison with Caucasian cases. *J Hum Genet* 62(9):809-814.

Boles RG, Buck EA, Blitzer MG, Platt MS, Cowan TM, Martin SK, Yoon H, Madsen JA, Reyes-Mugica M, Rinaldo P (1998) Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden death in the first year of life. *J Pediatr* 132(6):924-933.

Bonham JR and Downing M (1992) Metabolic deficiencies and SIDS. *J Clin Pathol* 42:33-38.

Botler J, Camacho LA, da Cruz MM, George P (2010) Triagem neonatal: o desafio de uma cobertura universal e efetiva. *Cien Saude Colet* 15:493-508.

Boutron A, Acquaviva C, Vianey-Saban C, de Lonlay P, de Baulny HO, Guffon N, Dobbelaere D, Feillet F, Labarthe F, Lamireau D et al. (2011) Comprehensive cDNA study and quantitative analysis of mutant HADHA and HADHB transcripts in a French cohort of 52 patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Mol Genet Metab* 103(4):341-348.

BRASIL (2001) Ministério da Saúde. Portaria nº 822/GM/MS, de 6 de junho de 2001. Institui, no âmbito do Sistema Único de Saúde, o Programa Nacional de Triagem Neonatal.

BRASIL (2008) Secretaria de Saúde do Distrito Federal. Lei Distrital nº 4.190, de 06 de agosto de 2008. Institui no Distrito Federal a Triagem Neonatal na modalidade ampliada.

BRASIL (2012) Ministério da Saúde. Portaria nº 2.829, de 14 de dezembro de 2012. Inclui a Fase IV no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), instituído pela Portaria nº 822/GM/MS, de 6 de junho de 2001.

Brusilow SW, Horwich AL (2001) The metabolic and molecular bases of inherited disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle AD, SlyW (eds) *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th edition. McGraw-Hill, New York, pp 1909-1963.

Brusilow SW, Koehler RC, Traystman RJ, Cooper AJ (2010) Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics* 7(4):452-470.

Bursle C, Weintraub R, Ward C, Justo R, Cardinal J, Coman D (2017) Mitochondrial Trifunctional Protein Deficiency: Severe Cardiomyopathy and Cardiac Transplantation. *JIMD Rep* 4:91-95.

Carneiro LCC (1992) *Porto Alegre da aldeia a metrópole*. Editora Gráfica metrópole, Porto Alegre, 176 pp.

Carpenter K, Pollitt RJ, Middleton B (1992) Human liver long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is a multifunctional membrane-bound beta-oxidation enzyme of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 183(2):443-448.

Caterino M, Chandler RJ, Sloan JL, Dorko K, Cusmano-Ozog K, Ingenito L, Strom SC, Imperlini E, Scolamiero E, Venditti CP et al (2016) The proteome of methylmalonic acidemia (MMA): the elucidation of altered pathways in patient livers. *Mol Biosyst* 12(2):566-574.

Chace DH, DiPerna JC, Mitchell BL, Sgroi B, Hofman LF and Naylor EW (2001) Electrospray tandem mass spectrometry for analysis of acylcarnitines in dried postmortem blood specimens collected at autopsy from infants with unexplained cause of death. *Clin Chem* 47(7):1166-1182.

Choi JH, Yoon HR, Kim GH, Park SJ, Shin YL, Yoo HW (2007) Identification of novel mutations of the HADHA and HADHB genes in patients with mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Int J Mol Med* 19:81-87.

Chuang DT and Shih VE (2001) Maple Syrup Urine Disease. In: Scriver CR, Beaudet L, Sly WS, Valle D (eds) *The metabolic and molecular bases of Inherited Disease*. 8th edition. McGraw. Hikk Inc, New York, pp 1971-2005.

Clarke JTR (2005) *A clinical guide to inherited metabolic diseases*. 3th edition. Cambridge University Press, Cambridge, 338 pp.

Cleveland WW, Green OC, Wilkins L (1962) Deaths in congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics* 29:3-17.

Cooper AJ (2001) Role of Glutamine in Cerebral Nitrogen Metabolism and Ammonia Neurotoxicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7(4):280-286.

Cote A, Russo P, Michaud J (1999) Sudden unexpected deaths in infancy: what are the causes? *J Pediatr* 135(4):437-443.

Baulny HO, Benoist JF, Rigal O, Touati G, Rabier D, Saudubray JM (2005) Methylmalonic and propionic acidemias: management and outcome. *J Inherit Metab Dis* 28(3):415-423.

Deal LW, Gomby DS, Zippiroli L, Behrman RE (2000) Unintentional injuries in childhood: analysis and recommendations. *Future Child* 10:4-22.

Den Boer MEJ, Ijlst L, Wijburg FA, Oostheim W, Van Werkhoven MA, Van Pampus MG, Heymans HAS, Wanders RJA (2000) Heterozygosity for the common LCHAD

mutation (1528G>C) is not a major cause of HELLP syndrome and the prevalence of the mutation in the dutch population is low. *Pediatr Res* 48(2):151-154.

Derks TG, Touw CM, Ribas GS, Biancini GB, Vanzin CS, Negretto G, Mescka CP, Reijngoud DJ, Smit GP, Wajner M et al. (2014) Experimental evidence for protein oxidative damage and altered antioxidant defense in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab* 37(5):783-789.

Diez-Fernandez C, Rüfenacht V, Häberle J (2017) Mutations in the Human Argininosuccinate Synthetase (ASS1) Gene, Impact on Patients, Common Changes, and Structural Considerations. Epub ahead of print.

Dionisi-Vici C, Deodato F, Roschinger W, Rhead W, Wilcken B (2006) 'Classical' organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis* 29(2-3):383-389.

Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M (1996) Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem J* 320:345-357.

Emery JL, Howat AJ, Variend S, Vawter GF (1988) Investigation of inborn errors of metabolism in unexpected infant death. *Lancet* 332:29-31.

Engel K, Höhne W, Häberle J (2009) Mutations and polymorphisms in the human argininosuccinate synthetase (ASS1) gene. *Hum Mutat* 30(3):300-307.

Ezgu F (2016) Inborn Errors of Metabolism. *Adv Clin Chem* 73:195-250.

Faghfoury H, Baruteau J, de Baulny HO, Häberle J, Schulze A (2011) Transient fulminant liver failure as an initial presentation in citrullinemia type I. *Mol Genet Metab* 102(4):413-417.

Felipo V and Butterworth RF (2002) Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 67:259-79.

Fenton WA, Gravel RA, Rosenblatt DS (2001) Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle AD, SlyW (eds). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th edition. McGraw-Hill, New York, pp 2165-2193.

Ferreira AC, Orlandi MP, Oliveira VC, Malta FS, Caxito FA, Gomes FA, Valadares ER, Godard AL (2009) A985G mutation incidence in the médium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene in Brazil. *Genet Mol Res* 8(2):487-493.

Feuchtbaum L, Carter J, Dowray S, Currier RJ, Lorey F (2012) Birth prevalence of disorders detectable through newborn screening by race/ethnicity. *Genet Med* 2012; 14:937-945. Epub ahead of print.

Fontella FU, Pulrolnik V, Gassen E, Wannmacher CM, Klein AB, Wajner M, Dutra-Filho CS (2000) Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. *Neuroreport* 11(3):541-544.

Forny P, Schnellmann A, Buerer C, Lutz S, Fowler B, Froese DS, Baumgartner MR (2016) Molecular Genetic Characterization of 151 Mut -Type Methylmalonic Aciduria Patients and Identification of 41 Novel Mutations in MUT. *Hum Mutat* 37(8):745-754.

Fowler B, Leonard JV, Baumgartner MR (2008) Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias. *J Inherit Metab Dis* 31(3):350-360.

França EB, Lansky S, Rego MAS, Malta DC, França JS, Teixeira R, Porto D, Almeida MF, Souza MFM, Szwarcwald CL et al. (2017) Leading causes of child mortality in Brazil, in 1990 and 2015: estimates from the Global Burden of Disease study. *Ver Bras Epidemiol* 20(Suppl 01):46-60.

Fraser JL e Venditti CP (2016) Methylmalonic and propionic acidemias: clinical management update. *Curr Opin Pediatr* 28(6):682-693.

Freytag SO, Beaudet AL, Bock HG, O'Brien WE (1984) Molecular structure of the human argininosuccinate synthetase gene: occurrence of alternative mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 4(10):1978-1984.

Froese DS, Kochan G, Muniz JR, Wu X, Gileadi C, Ugochukwu E, Krysztofinska E, Gravel RA, Oppermann U, Yue WW (2010) Structures of the human GTPase MMAA and vitamin B12-dependentmethylmalonyl-CoA mutase and insight into their complex formation. *J Biol Chem* 285(49):38204-38213.

Gao H, Kobayashi K, Tabata A, Tsuge H, Iijima M, Yasuda T, Kalkanoglu HS, Dursun A, Tokatli A, Coskun T et al. (2003) Identification of 16 novel mutations in the argininosuccinate synthetase gene and genotype-phenotype correlation in 38 classical citrullinemia patients. *Hum Mutat* 22:24-34.

Giugliani R (1988) Erros inatos do metabolismo - uma visão panorâmica. *Pediatr Mod* 23:29-30.

Gomes M, Santos LM, Vilanova LCP (2005) Encefalopatias Crônicas Progressivas. In: Morais MB et al. (eds) *Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar*. 1st edition. São Paulo, pp 1291-1309.

Gramer G, Nennstiel-Ratzel U, Hoffmann GF (2018) 50 Jahre Neugeborenen screening in Deutschland – Bisherige Ergebnisse und zukünftige Herausforderungen, *Monatsschr. Kinderheilkd* 166:987.

Green A, Preece MA, Hardy D (2002) More on the metabolic autopsy. *Clin Chem* 48:964-965.

Gregersen N and Olsen RKJ (2010) Disease mechanisms and protein structures in fatty acid oxidation defects. *J Inherit Metab Dis* 33(5):547-553.

Gropman AL, Summar M, Leonard JV (2007) Neurological implications of urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis* 30(6):865-79.

Häberle J, Pauli S, Linnebank M, Kleijer WJ, Bakker HD, Wanders RJ, Harms E, Koch HG (2002) Structure of the human argininosuccinate synthetase gene and an improved system for molecular diagnostics in patients with classical and mild citrullinemia. *Hum Genet* 110:327-333.

Häberle J, Pauli S, Schmidt E, Schulze-Eilfing B, Berning C, Koch HG (2003) Mild citrullinemia in Caucasians is an allelic variant of argininosuccinate synthetase deficiency (citrullinemia type 1). *Mol Genet Metab* 80(3):302-306.

Häberle J, Boddaert N, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Huemer M, Karall D, Martinelli D, Crespo PS, Santer R et al. (2012) Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet J Rare Dis* 7:32.

Hagenfeldt L, Venizelos N, von Döbeln U (1995) Clinical and biochemical presentation of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 18(2):245-248.

Han L, Wu S, Han F, Gu X (2015) Insights into the molecular mechanisms of methylmalonic acidemia using microarray technology. *Int J Clin Exp Med* 8(6):8866-8879.

Hörster F e Hoffmann GF (2004) Pathophysiology, diagnosis, and treatment of methylmalonic aciduria—recent advances and new challenges. *Pediatr Nephrol* 19(10):1071-1074.

Hörster F, Baumgartner MR, Viardot C, Suormala T, Burgard P, Fowler B, Hoffmann GF, Garbade SF, Kölker S, Baumgartner ER (2007) Long-term outcome in methylmalonic acidurias is influenced by the underlying defect (mut0,mut-, cblA, cblB). *Pediatr Res* 62(2):225-230.

Houten SM, Violante S, Ventura FV, Wanders RJ (2016) The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid β -oxidation and its genetic disorders. *Annu Rev Physiol* 78:23-44.

IBGE (2010) Censo demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

IBGE (2015) Projeção da População do Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) – 2013.

Ijlst L, Wanders RJ, Ushikubo S, Kamijo T, Hashimoto T (1994) Molecular basis of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of the major disease-causing mutation in the alpha-subunit of the mitochondrial trifunctional protein. *Biochim Biophys Acta* 1215(3):347-350.

Ijlst L, Ruiten JP, Vreijling J, Wanders RJ (1996) Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: a new method to identify the G1528C mutation in genomic DNA showing its high frequency (approximately 90%) and identification of a new mutation (T2198C). *J Inher Metab Dis* 19(2):165-168.

Jardim MLT and Barcellos TM (2012) Migrações no Rio Grande do Sul. *Revista Paranaense De Desenvolvimento* 121:133-147.

Joost K, Ounap K, Zordania R, Uudelepp M-L, Olsen RK, Kall K, Kilik K, Soomets U, Kahre T (2012) Prevalence of Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency in Estonia. *JIMD Rep* 2:79-85.

Kaku N, Ihara K, Hirata Y, Yamada K, Lee S, Kanemasa H, Motomura Y, Baba H, Tanaka T, Sakai Y et al. (2018) Diagnostic potential of stored dried blood spots for

inborn errors of metabolism: a metabolic autopsy of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Clin Pathol* 71(10):885-889.

Karlberg T, Collins R, van den Berg S, Flores A, Hammarström M, Högbom M, Holmberg Schiavone L, Uppenberg J (2008) Structure of human argininosuccinate synthetase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64:279-286.

Kasper DC, Ratschmann R, Metz TF, Mechtler TP, Möslinger D, Konstantopoulou V, Item CB, Pollak A, Herkner KR (2010) The national Austrian newborn screening program - eight years experience with mass spectrometry. Past, present, and future goals. *Wien Klin Wochenschr* 122(21-22):607-613.

Kleijer WJ, Garritsen VH, van der Sterre MLT, Berning C, Häberle J, Huijmans JGM (2006) Prenatal diagnosis of citrullinemia and argininosuccinic aciduria: evidence for a transmission ratio distortion in citrullinemia. *Prenat Diagn* 26(3):242-247.

Kölker S, Garcia-Cazorla A, Valayannopoulos V, Lund AM, Burlina AB, Sykut-Cegielska J, Wijburg FA, Teles EL, Zeman J, Dionisi-Vici C et al. (2015) The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 1: the initial presentation. *J Inherit Metab Dis* 38(6):1041-1057.

Kose E, Unal O, Bulbul S, Gunduz M, Häberle J, Arslan N (2017) Identification of three novel mutations in fourteen patients with citrullinemia type 1. *Clin Biochem* 50(12):686-689.

Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG and Mitchell EA (2004) Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 114:234-238.

Laróvere LE, Ruiz SM, Angaroni CJ, de Kremer RD (2012) Molecular epidemiology of citrullinemia type I in a risk region of Argentina: a first step to preconception heterozygote detection. *JIMD Rep* 6:27-29.

Laytano D (1974) Legado luso-açoriano na formação do Rio Grande do Sul. Centro Regional de Pesquisas Educacionais. Porto Alegre.

Leal MC, Costa EA, Klein, CE, Szwarcwald CL, Barata PC (1985) Migração interna e pressão arterial no Rio Grande do Sul. *Cadernos de Saúde Pública* 1:207-219.

Ledley FD, Lumetta MR, Zoghbi HY, VanTuinen P, Ledbetter SA and Ledbetter DH (1988) Mapping of human methylmalonyl CoA mutase (MUT) locus on chromosome 6. *Am J Hum Genet* 42(6):839-46.

Lee BH, Kim YM, Heo SH, Kim GH, Choi IH, Lee BS, Kim EA, Kim KS, Jhang WK, Park SJ et al. (2013) High prevalence of neonatal presentation in Korean patients with citrullinemia type 1, and their shared mutations. *Mol Genet Metab* 108:18-24.

Leonard JV (2006) Disorders of the Urea Cycle and Related Enzymes. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH (eds). *Inborn Metabolic Diseases*. 4th edition. Springer, Heidelberg, pp 263-72.

Leonard JV and Morris AA (2002) Urea cycle disorders. *Semin Neonatol* 7:27-35.

Liascovich R, Rittler M, Castilla EE (2001) Consanguinity in South America: Demographic Aspects. *Hum Hered* 51(1-2):27-34.

Lindner M, Hoffmann GF, Matern D (2010) Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *J Inherit Metab Dis* 33(5):521–526.

Lindor NM e Karnes OS (1995) Initial assessment of infants and children with suspected inborn errors of metabolism. *Mayo Clin Proc* 70(10):987-988.

Loughrey CM, Preece MA, Green A (2005) Sudden unexpected death in infancy (SUDI). *J Clin Pathol* 58:20-21.

Mak CM, Lee HCH, Chan AYW and Lam CW (2013) Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: Review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci* 50(6):142-162.

Manoli I, Sysol JR, Li L, Houillier P, Garone C, Wang C, Zervas PM, Cusmano-Ozog K, Young S, Trivedi NS et al. (2013) Targeting proximal tubule mitochondrial dysfunction attenuates the renal disease of methylmalonic acidemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(33):13552-13557.

McMurray WC, Mohyuddin F, Rossiter RJ, Rathbun JC, Valentine GH, Koegler SJ, Zervas DE (1962) Citrullinuria: a new aminoaciduria associated with mental retardation. *Lancet* 1:138.

Mirandola SR, Melo DR, Schuck PF, Ferreira GC, Wajner M, Castilho RF (2008) Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J Inherit Metab Dis* 31:44-54.

Moon RY, Horne RSC, Hauck FR (2007) Sudden infant death syndrome. *Lancet* 370:1578-1587.

Moore A, DeBelle G, Symonds L, Green A (2000) Investigation of sudden unexpected deaths in infancy. *Arch Dis Child* 83(3):276.

Morris SM (2004) Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 134(Suppl 10):S2743-S2747.

Moura RR, Coelho, AVC, Balbino VQ, Crovella S, Brandão LAC (2015) Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *Am J Hum Biol* 27(5):674-680.

Nedoszytko B, Siemińska A, Strapagiel D, Dąbrowski S, Słomka M, Sobalska-Kwapis M, Marciniak B, Wierzba J, Skokowski J et al. (2017) High prevalence of carriers of variant c.1528G>C of HADHA gene causing long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD) in the population of adult Kashubians from North Poland. *PLoS One* 12(11):e0187365.

Netto CBO (1997) Deficiência de MCAD no sul do Brasil: uma abordagem molecular. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Nham SU, Wilkemeyer MF, Ledley FD (1990) Structure of the human methylmalonyl-CoA mutase (MUT) locus. *Genomics* 8(4):710-716.

Niu DM, Chien YH, Chiang CC, Ho HC, Hwu WL, Kao SM, Chiang SH, Kao CH, Liu TT, Chiang H et al. (2010) Nationwide survey of extended newborn screening by tandem mass spectrometry in Taiwan. *J Inherit Metab Dis* 33(Suppl 2):S295-S305.

Nsiah-Sefaa A and McKenzie M (2016) Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid β -oxidation in mitochondrial disease. *Biosci Rep* 36:e00313-e00313.

Oberholzer VG, Levin B, Burgess EA, Young WF (1967) Methylmalonic aciduria. An inborn error of metabolism leading to chronic metabolic acidosis. *Arch Dis Child* 42(225):492-504.

ODM Brasil (2016) Os objetivos do desenvolvimento do milênio. [Internet]. Disponível em: www.odmbrasil.gov.br/os-objetivos-de-desenvolvimento-do-milenio. Acess: mai 2019.

Okun JG, Hörster F, Farkas LM, Feyh P, Hinz A, Sauer S, Hoffmann GF, Unsicker K, Mayatepek E, Kölker S (2002) Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. *J Biol Chem* 277(17):14674-14680.

Olpin SE, Clark S, Andresen BS, Bischoff C, Olsen RK, Gregersen N, Chakrapani A, Downing M, Manning NJ, Sharrard M et al. (2005) Biochemical, clinical and molecular findings in LCHAD and general mitochondrial trifunctional protein deficiency. *J Inherit Metab Dis* 28(4):533-44.

Pampols T (2010) Inherited metabolic rare disease. *Adv Exp Med Biol* 686:397-431.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:177-82.

Pastinen T, Perola M, Ignatius J, Sabatti C, Tainola P, Levander M, Syvänen AC, Peltonen L (2001) Dissecting a population genome for targeted screening of disease mutations. *Hum Mol Genet* 10(26):2961-2972.

Piekutowska-Abramczuk D, Olsen RKJ, Wierzba J, Popowska E, Jurkiewicz D, Ciara E, Ołtarzewski M, Gradowska W, Sykut-Cegielska J, Krajewska-Walasek M et al. (2010) A comprehensive HADHA c.1528G>C frequency study reveals high prevalence of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency in Poland. *J Inherit Metab Dis* 33 (Suppl 3):S373-S377.

Poretti A, Blaser SI, Lequin MH, Fatemi A, Meoded A, Northington FJ, Boltshauser E, Huisman TAGM (2013) Neonatal neuroimaging findings in inborn errors of metabolism. *J Magn Reson Imaging* 37(2):294-312.

Primassin S, Ter Veld F, Mayatepek E, Spiekerkoetter U (2008) Carnitine supplementation induces acylcarnitine production in tissues of very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient mice, without replenishing low free carnitine. *Pediatr Res* 63(6):632-637.

Raghuveer TS, Garg U, Garf WD (2006) Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: an update. *Am Fam Physician* 73(11):1981-1990.

Rector RS, Payne RM, Ibdah JA (2008) Mitochondrial trifunctional protein defects: clinical implications and therapeutic approaches. *Adv Drug Deliv Rev* 60(13-14):1488-1496.

Ribas GS, Manfredini V, de Mari JF, Wayhs CY, Vanzin CS, Biancini GB, Sitta A, Deon M, Wajner M, Vargas CR (2010) Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *Int J Dev Neurosci* 28(2):127-132.

Rinaldo P, Matern D, Bennet MJ (2002) Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol*. 64:477-502.

Rocha JC, Siqueira S, Cabral A, de Almeida MF (2009) Consenso para o tratamento nutricional das Doenças do Ciclo da Uréia. *Acta Pediatr Port* 40(2):83-93.

Rocha H, Castiñeiras D, Delgado C, Egea J, Yahyaoui R, González Y, Conde M, González I, Rueda I, Rello L et al (2014) Birth Prevalence of Fatty Acid β -Oxidation Disorders in Iberia. *JIMD Rep* 16:89-94.

Rodriguez PC, O'Flaherty CM, Beconi MT, Beorlegui NB (2005) Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim Reprod Sci* 85(3-4):231-242.

Saad LO, Mirandola SR, Maciel EN, Castilho RF (2006) Lactate dehydrogenase activity is inhibited by methylmalonate in vitro. *Neurochem Res* 31(4):541-548.

Sakamoto O, Ohura T, Matsubara Y, Takayanagi M, Tsuchiya S (2007) Mutation and haplotype analyses of the MUT gene in Japanese patients with methylmalonic acidemia. *J Hum Genet* 52:48-55.

Salamoni G. (2001). A imigração alemã no Rio Grande do Sul—o caso da comunidade pomerana de Pelotas. *História em revista* 7:25-42.

Sander J, Sander S, Steuerwald U, Janzen N, Peter M, Wanders RJ, Marquardt I, Korenke GC, Das AM (2005) Neonatal screening for defects of the mitochondrial trifunctional protein. *Mol Genet Metab* 85(2):108-114.

Saudubray JM e Charpentier C (2001) Clinical phenotypes: Diagnosis/algorithms. In: Scriver CR et al (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. 8th edition. New York, pp 327-400.

Saudubray JM, Sedel F, Walter JH (2006) Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *J Inherit Metab Dis* 29(2-3):261-274.

Schwartz IV, de Souza CF, Giugliani R (2008) Treatment of inborn errors of metabolism. *J Pediatr (Rio J)* 84(4):S8-S19.

Saudubray JM and Garcia-Cazorla A (2018) Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am* 65(2):179-208.

Shapiro-Mendoza (2007). Sudden unexplained infant deaths: introduction. In: Sudden unexplained infant death: a systematic training program for the professional infant death investigation specialist. Atlanta: Dept of Health and Human Services. [internet]. Disponível em: http://www.cdc.gov/sids/pdf/suidmanual/chapter1_tag508.pdf. Acess: mai 2019.

Sims HF, Brackett JC, Powell CK, Treem WR, Hale DE, Bennett MJ, Gibson B, Shapiro S, Strauss AW (1995) The molecular basis of pediatric long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with maternal acute fatty liver of pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(3):841-845.

Spiekerkoetter U (2010) Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 33(5):527-32.

Spiekerkoetter U, Lindner M, Santer R, Grotzke M, Baumgartner MR, Boehles H, Das A, Haase C, Hennermann JB, Karall D et al. (2009) Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop. *J Inherit Metab Dis* 32(4):488-497.

Stojiljkovic M, Klaassen K, Djordjevic M, Sarajlija A, Brasil S, Kecman B, Grkovic S, Kostic J, Rodriguez-Pombo P, Desviat LR et al. (2016) Molecular and phenotypic characteristics of seven novel mutations causing branched-chain organic acidurias. *Clin Genet* 90(3):252-257.

Su TS, O'Brien WE, Beaudet AL (1984) Genomic DNA-mediated gene transfer for argininosuccinate synthetase. *Somat Cell Mol Genet* 10(6):601-606.

Summar M and Tuchman M (2001) Proceedings of a consensus conference for the management of patients with urea cycle disorders. *J Pediatr* 138(Suppl):S6-S10.

Summar ML, Koelker S, Freedenberg D, Le Mons C, Haberle J, Lee HS, Kirmse B (2013) The incidence of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab* 110(1-2):179-180.

Sweetman L, Millington DS, Therrell BL, Hannon WH, Popovich B, Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, van Dyck PC (2006) Naming and counting disorders (conditions) included in newborn screening panels. *Pediatrics* 117(Suppl 3):S308-314.

Sykut-Cegielska J, Gradowska W, Piekutowska-Abramczuk D, Andresen BS, Olsen RK, Ołtarzewski M, Pronicki M, Pajdowska M, Bogdańska A, Jabłońska E et al. (2011) Urgent metabolic service improves survival in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency detected by symptomatic identification and pilot newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 34:185-95.

Therrell BL (2001) U.S. Newborn screening policy dilemmas for the twenty-first century. *Mol Gen Metab* 74(1-2):64-74.

Tofteng F, Hauerberg J, Hansen BA, Pedersen CB, Jørgensen L, Larsen FS (2006) Persistent arterial hiperammonemia increases the concentration of glutamine and alanine in the brain and correlates with intracranial pressure in patients with fulminant hepatic failure. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:21-27.

Tyni T and Pihko H (1999) Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatr* 88(3):237-45.

Uchino T, Endo F, Matsuda I (1998) Neurodevelopmental outcome of long-term therapy of urea cycle disorders in Japan. *J Inher Metab Dis* 21:151-9.

van Rijt WJ, Koolhaas GD, Bekhof J, Heiner Fokkema MR, de Koning TJ, Visser G, Schielen PCJ, van Spronsen FJ and Derks TGJ (2016) Inborn Errors of Metabolism That Cause Sudden Infant Death: A Systematic Review with Implications for Population Neonatal Screening Programmes. *Neonatology* 109(4):297-302.

Vockley J and Whiteman DA (2002) Defects of mitochondrial beta-oxidation: a growing group of disorders. *Neuromuscul Disord* 12(3):235-246.

Volpe FM, Abrantes MM, Capanema FD, Chaves JG (2009) The impact of changing health indicators on Infant mortality rates in Brazil, 2000 and 2005. *Rev Panam Salud Publica* 26(6):478-84.

Wanders RJ, Duran M, Ijlst L, De Jager JP, Van Gennip AH, Jakobs C, Dorland L, Van Sprang FJ (1989) Sudden infant death and long-chain 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase. *Lancet* 2(8653):52-53.

Wanders RJ, Ruiten JP, Ijlst L, Waterham HR, Houten SM (2010) The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. *J Inher Metab Dis* 33(5):479-494.

Whittington PF, Alonso EM, Boyle JT, Molleston JP, Rosenthal P, Emond JC, Millis JM (1998) Liver transplantation for the treatment of urea cycle disorders. *J Inher Metab Dis* 21(Suppl 1):S112-S118.

Wilcox RL, Nelson CC, Stenzel P, Steiner RD (2002) Postmortem screening for fatty acid oxidation disorders by analysis of Guthrie cards with tandem mass spectrometry in sudden unexpected death in infancy. *J. Pediatr* 141(6):833-836.

Wilson JMG and Jungner G (1968) Principles and Practice of Screening for Disease. World Health Organization (WHO) Bulletin, Public Health Papers. [Internet] Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/php/WHO_PHP_34.pdf Acesso: mai 2019.

Woo HI, Park HD, Lee YW (2014) Molecular genetics of citrullinemia types I and II. *Clin Chim Acta* 431:1-8.

Worgan LC, Niles K, Tirone JC, Hofmann A, Verner A, Sammak A, Kucic T, Lepage P, Rosenblatt DS (2006) Spectrum of Mutations in mut Methylmalonic Acidemia and Identification of a Common Hispanic Mutation and Haplotype. *Hum Mutat* 27:31-43.

Yamamoto T, Mishima H, Mizukami H, Fukahori Y, Umehara T, Murase T, Kobayashi M, Mori S, Nagai T, Fukunaga T et al. (2015) Metabolic autopsy with next generation sequencing in sudden unexpected death in infancy: postmortem diagnosis of fatty acid oxidation disorders. *Mol Genet Metab Rep* 5:26-32.

Yang BH, Heng H, Ding J-H, Roe C (1996) The genes for the a and b subunits of the mitochondrial trifunctional protein are both located in the same region of human chromosome 2p23. *Genomics* 37:141-3.

Zhu JM, Yang Z, Yu M, Wang R, Ye RH, Yang HX, Zhai GR, Wang Q (2005) Screening for the G1528C mutation in long chain fatty acid oxidation enzyme in Han nationality in Beijing population. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37:72-74.

Zsengellér ZK, Aljinovic N, Teot LA, Korson M, Rodig N, Sloan JL, Venditti CP, Berry GT, Rosen S (2014) Methylmalonic acidemia: a megamitochondrial disorder affecting the kidney. *Pediatr. Nephrol* 29(11):2139-2146.

ANEXOS

Anexo I Ficha de coleta de dados

FICHA DE COLETA DE DADOS

Título do Projeto: Identificação de heterozigotos para a Erros Inatos do Metabolismo associados à morte súbita: investigação da prevalência de mutações em doadores de sangue voluntários no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

1. Nome:

2. Data de nascimento:

3. Local de nascimento:

4. Ancestralidade europeia

- . Qual? Alemã
 Italiana
 Portuguesa
 Outra _____
 Não Não sabe

5. Consanguinidade na família

- Não sabe NÃO SIM

6. Histórico familiar de morte súbita (em crianças menores de um ano de idade)

- Não sabe NÃO SIM

Telefone para contato:

Rubrica do pesquisador _____

Anexo II Carta de aprovação do projeto



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 170249

Data da Versão do Projeto: 11/05/2017

Pesquisadores:

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

FERNANDA SPERB LUDWIG

FERNANDA SALES LUIZ VIANNA

Título: Identificação de heterozigotos para a Erros Intatos do Metabolismo associados à morte súbita: investigação da prevalência de mutações em doadores de sangue voluntários no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)



Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA

Porto Alegre, 23 de maio de 2017.

Anexo III Comprovante de submissão do artigo

JIMD Reports - Submission Notification to co-author

JIMD Reports <em@editorialmanager.com>

 to me ▾

Body:

Re: "Prevalence of the most common pathogenic variants in three genes for inborn errors of metabolism associated with sudden unexpected infant in infancy: a population-based study in Southern Brazil"

Full author list: Dévora Natalia Randon, Msc; Fernanda Hendges de Bitencourt, phd; Fernanda Sperb-Ludwig, phd; Fernanda Sales Luiz Vianna, phd; Ana Paula Pizzio Becker; Carmen Regla Vargas, phd; Angela Sitta; Alexia Nadel Sant'Ana; Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Dear Miss Dévora Randon,

We have received the submission entitled: "Prevalence of the most common pathogenic variants in three genes for inborn errors of metabolism associated with sudden unexpected infant in infancy: a population-based study in Southern Brazil" for possible publication in JIMD Reports, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. M.D., Ph.D Ida Vanessa Doederlein Schwartz who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

JIMD Reports Editorial Office
JIMD Reports

Please be aware that if you ask to have your user record removed, we will retain your name in the records concerning manuscripts for which you were an author, reviewer, or editor.

APÊNDICES

8 APÊNDICES

Produção científica correspondente ao período de mestrado em áreas afins.

8.1. Genetic diagnosis and genotype-phenotype association in 113 Brazilian individuals with reduced biotinidase activity.

Randon DN, Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Carvalho de Andrade MDF, Ribeiro E, Medeiros P, Félix TM, Pinto LLC, de Souza CFM, Schwartz IVD.

XII Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. Buenos Aires, Argentina. Maio, 2019.

Modalidade de apresentação: Oral.

Buenos Aires, 15 de Mayo de 2019

Por cuanto el trabajo

GENETIC DIAGNOSIS AND GENOTYPE-PHENOTYPE ASSOCIATION IN 113 BRAZILIAN INDIVIDUALS WITH REDUCED BIOTINIDASE ACTIVITY

Randon DN, Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Carvalho de Andrade MDF, Ribeiro E, Medeiros P, Félix TM, Pinto LLC, de Souza CFM, Schwartz IVD - Brasil

Ha sido presentado en la modalidad COMUNICACIÓN ORAL

Se extiende el presente certificado que lo acredita.


Dra. Carolina Fischinger M de Souza
Presidente: Comité Científico
Errores Innatos del Metabolismo


Dr. José E. Abdenur
Presidente
SLEIMPN 2019


Dr. Gustavo J. C. Barajo
Presidente: Comité Científico
Pesquisa Neonatal



8.2. Diagnóstico genético e associação genótipo-fenótipo de 35 indivíduos brasileiros com atividade reduzida de biotinidase.

Randon DN, Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Donis KC, Ribeiro E, de Souza CFM, Medeiros P, Schwartz IVD.

38ª Semana Científica do HCPA. Porto Alegre, Brasil. Outubro, 2018.

Modalidade de apresentação: E-Pôster.

38^a  **Semana Científica do HCPA** **Tecnologias disruptivas em saúde**
22 a 26 de outubro de 2018

Certificamos que o trabalho **DIAGNÓSTICO GENÉTICO E ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO DE 35 INDIVÍDUOS BRASILEIROS COM ATIVIDADE REDUZIDA DE BIOTINIDASE** de autoria de DÉVORA RANDON; TACIANE BORSATTO; FERNANDA SPERB-LUDWIG; KARINA CARVALHO DONIS; ERLANE RIBEIRO; CAROLINA FISCHINGER MOURA DE SOUZA; PAULA MEDEIROS; IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ, foi apresentado na modalidade E-POSTER na 38ª Semana Científica do HCPA, realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 22 a 26 de outubro de 2018.


Prof. Nadine Oliveira Clausell
Diretora-Presidente do Hospital de Clínicas


Prof. Patricia Ashton-Prolla
Coordenadora de GPGS

a autenticidade deste documento pode ser verificada através da URL:
<https://sgce.hcpa.edu.br/sgce/validar/A9F12D21>

8.3. Erros inatos do metabolismo associados à morte súbita: investigação da frequência da variante patogênica c.199T>C no gene ACADM em indivíduos saudáveis do Rio Grande do Sul.

Sant'ana AN, Bitencourt FH; Randon DN, Portela LF, Becker APP, Sperb-Ludwig F, Vianna FSL, Schwartz IVD

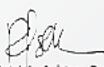
38ª Semana Científica do HCPA. Porto Alegre, Brasil. Outubro, 2018.

Modalidade de apresentação: E-Pôster.

38ª  **Semana Científica do HCPA** **Tecnologias disruptivas em saúde**
22 a 26 de outubro de 2018

Certificamos que o trabalho **ERROS INATOS DO METABOLISMO ASSOCIADOS À MORTE SÚBITA: INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DA VARIANTE PATOGENICA C.199T>C NO GENE ACADM EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS DO RIO GRANDE DO SUL** de autoria de **ALEXIA NEDEL SANT'ANA; FERNANDA HENDGES DE BITENCOURT; DÉVORA NATÁLIA RANDON; LUIZ FELIPE PORTELA; ANA PAULA PIZZIO BECKER; FERNANDA SPERB LUDWIG; FERNANDA SALES LUIZ VIANNA; IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ**, foi apresentado na modalidade E-POSTER na 38ª Semana Científica do HCPA, realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 22 a 26 de outubro de 2018.


Prof. Nadine Oliveira Clausell
Diretora-Presidente do Hospital de Clínicas


Prof. Patricia Ashton-Prolla
Coordenadora do GPPG

Promoção

a autenticidade deste documento pode ser verificada através da URL:
<https://sgce.hcpa.edu.br/sgce/validar/070D10EE>

8.4. Diagnóstico genético e associação genótipo-fenótipo de 30 indivíduos brasileiros com atividade reduzida de biotinidase.

Randon DN, Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Donis KC, Ribeiro E, de Souza CFM, Medeiros P, Schwartz IVD

XXX Congresso Brasileiro de Genética Médica, VII Congresso Brasileiro da SBTEIM e IV Congresso Brasileiro de Enfermagem em Genética e Genômica. Rio de Janeiro, Brasil. Maio, 2018.

Modalidade de apresentação: Oral.



