

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

DANIEL ROCHA DE CARVALHO

**Avaliação clínica, genética e neurorradiológica
de pacientes brasileiros com hiperargininemia**

Brasília-DF
2012

DANIEL ROCHA DE CARVALHO

**Avaliação clínica, genética e neurorradiológica
de pacientes brasileiros com hiperargininemia**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Professor Doutor Riccardo Pratesi

Coorientador: Doutor Jaime Moritz Brum

Brasília-DF
2012

Carvalho, Daniel Rocha de
Avaliação clínica, genética e neurorradiológica de pacientes
brasileiros com hiperargininemia / Daniel Rocha de Carvalho. Brasília, UnB,
Faculdade de Medicina, 2012.

111p

Orientador: Riccardo Pratesi

Coorientador: Jaime Moritz Brum

Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Faculdade de
Medicina, 2012.

1. Hiperargininemia. 2. Arginase. 3. Paraparesia espástica 4. Imagem
por ressonância magnética. – Tese. I. Tese (Doutorado) – Faculdade de
Medicina. II. Título.

Aos meus filhos, Pedro e Rodrigo, razão de todo esforço. A minha Gabriela, como prova de amor. Aos meus pais, pela minha eterna gratidão.

‘O que não tem remédio, remediado está.’

Adágio popular

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos **pacientes e seus familiares**, que nos ensinam muito mais que qualquer literatura médica.

Obrigado a todos da **minha família**, minha esposa, meus filhos, meus pais, meus irmãos e aos meus primos que sempre me apoiam.

Ao **Dr. Riccardo Pratesi**, pelo exemplo, pelo estímulo e por sempre me ajudar a transpor barreiras.

Ao **Dr. Jaime Brum**, por me ensinar a pensar nas doenças que não são comuns e a gostar de estudar as doenças metabólicas.

Obrigado ao **Dr. Carlos Eduardo Speck Martins** e ao **Dr. Luciano Farage**, pela amizade, por manter sempre acesa a vontade científica e pelo constante estímulo positivo.

Agradeço aos meus colegas colaboradores deste estudo, **Guilherme Brand, Reinaldo Takata, Bernardo Martins e Fabrício Ventura**, pela dedicação e apoio ao desenvolvimento deste trabalho. Meu agradecimento ao **Luiz Guilherme Nadal**, pelo entusiasmo no estudo estatístico deste trabalho.

Agradeço aos meus queridos amigos do Setor de Genética Médica do Hospital SARA-Brasília, **Dra. Ana Luiza Coelho, Dra. Isabela Rizzo e Nutricionista Alessandra Oliveira**, pelo companheirismo.

Obrigado a **Dra. Mônica Navarro, Dra. Kátia Coelho, Dr. Dalton Portugal** e a todos os médicos da Rede SARA que contribuíram preciosamente para que este trabalho pudesse ser feito.

Agradeço a todos os colegas do **Setor de Radiologia do Hospital SARA-Brasília**. Presto também minha gratidão a toda a **Equipe do Laboratório de Biologia Molecular**, a toda a Equipe do **Laboratório de Bioquímica Analítica** e a toda a **Equipe do Laboratório de Bioquímica Genética** do Hospital SARA-Brasília. Agradeço a todos que me ajudaram de forma inestimável para a realização deste trabalho.

Agradeço à **direção** e a **todos os profissionais da Rede SARA** que contribuíram diretamente ou indiretamente para que o trabalho pudesse ser executado.

Aos meus mentores em Genética Clínica, **Dr. João Monteiro de Pina Neto, Dra. Ester Silveira Ramos e Dr. Luiz César Peres**, obrigado por ajudar na minha formação.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 PREVALÊNCIA E HERANÇA.....	12
1.2 HISTÓRICO.....	13
1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E CURSO DA DOENÇA	13
1.4 NEUROIMAGEM.....	16
1.5 ANORMALIDADES BIOQUÍMICAS.....	17
1.6 FISIOPATOLOGIA	20
1.7 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	21
1.8 TRATAMENTO.....	22
1.9 DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL E TRIAGEM NEONATAL	24
2. MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS.....	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 GRUPO AMOSTRAL E ASPECTOS ÉTICOS	27
4.2 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS.....	27
4.3 DOSAGEM QUANTITATIVA DE AMINOÁCIOS EM SANGUE.....	27
4.4 DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ARGINASE EM ERITRÓCITOS.....	28
4.5 INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE <i>ARG1</i>	28
4.6 IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E ESPECTROSCOPIA DE PRÓTONS (ERM).....	29
4.7 ELETROENCEFALOGRAMA (EEG).....	29
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5. RESULTADOS	31

ARTIGO 1	32
ARTIGO 2	53
ARTIGO 3	77
6. DISCUSSÃO	94
7. CONCLUSÕES	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO 1	106
ANEXO 2	107
ANEXO 3	108

RESUMO

A hiperargininemia (HA) é uma doença metabólica rara, autossômica recessiva e com apresentação clínica que usualmente é diferente dos outros distúrbios do ciclo da ureia, sendo incomum a ocorrência de crises de encefalopatia por hiperamonemia. A doença HA é causada pela deficiência da enzima arginase I, codificada pelo gene *ARG1*. Trata-se de uma das poucas doenças tratáveis que provocam paraparesia espástica e por isso deve ser uma condição diagnosticada precocemente. Não há estudos publicados sobre HA na população brasileira.

Foram avaliados, retrospectivamente, a idade de início da doença, o quadro clínico, as manifestações neurológicas, a progressão dos sinais e os exames bioquímicos laboratoriais de 16 pacientes brasileiros com HA. Nesta série de casos, foram investigados: (1) as mutações no gene *ARG1* e a correlação com atividade enzimática residual da arginase em eritrócitos; (2) as alterações de neuroimagem por ressonância magnética do encéfalo e de espectroscopia de prótons; e (3) as anormalidades eletroencefalográficas.

A diplegia espástica progressiva foi o principal agravo neurológico, havendo grande variabilidade quanto à idade de início e também a respeito da velocidade de progressão deste sinal. A autorrestrrição de proteínas na dieta foi um sinal muito frequente. A ocorrência de epilepsia foi mais frequente neste estudo do que o relatado na literatura e apenas um único paciente não teve grafoelementos patológicos epileptiformes. A urgência urinária foi uma manifestação tardia na evolução da HA e observado em poucos pacientes.

Três mutações já conhecidas foram encontradas (p.R21X; p.I11T e p.W122X) e cinco novas mutações foram identificadas (p.G27D; p.G74V; p.T134I; p.R308Q e p.I174fs179). A mutação p.T134I foi a mais frequente, sempre em homozigose, o que pode sugerir um efeito fundador. Os pacientes com a mutação p.R308Q tiveram atividade enzimática residual estatisticamente maior comparando-se ao restante do grupo, mas sem um fenótipo distinto. As anormalidades de neuroimagem foram atrofia cerebral variável e/ou leve atrofia cerebelar. A espectroscopia de prótons pela teve resultado considerado normal.

Informações relevantes sobre a história natural e também sobre variabilidade do quadro clínico da HA foram consolidadas neste estudo. As características clínicas que ajudam no diagnóstico diferencial de paralisia cerebral e de paraplegia espástica hereditária foram ressaltadas. Os achados de neuroimagem são inespecíficos e, assim como a espectroscopia, não auxiliam no diagnóstico da HA. O painel de mutações no gene *ARG1* que causam a HA foi expandido. Uma evidente correlação genótipo-fenótipo na HA não foi observada.

ABSTRACT

Hiperargininemia (HA) is a rare autosomal recessive metabolic disease. The clinical presentation is typically different from the other disorders of the urea cycle, and crises of hyperammonemic encephalopathy are uncommon. HA is caused by a deficiency of the arginase I enzyme, encoded by the *ARG1* gene. HA is one of the few treatable diseases leading to spastic paraplegia and must be precociously diagnosed. There are no previous published studies on HA in the Brazilian population.

In this study we review the age onset of disease, the clinical picture, the neurological manifestations, the progression of signs, and the biochemical laboratory abnormalities of 16 Brazilian patients with HA. In this series of cases, other features were also investigated: (1) the mutations of *ARG1* gene and its correlation with decreased enzyme activity of arginase in red blood cells; (2) the abnormalities of brain magnetic resonance imaging and brain magnetic resonance spectroscopy (MRS) and (3) the abnormalities of electroencephalography (EEG).

Progressive spastic diplegia was the main neurological feature presenting great variability regarding age of onset and progression rate of this sign. The self-restriction dietary protein was a very common finding. The occurrence of seizures was more frequent in this study than reported in the literature, and only one patient had no epileptic findings on EEG. Urinary urgency was an occasional manifestation that developed late in the course of few patients with HA.

Three known mutations were found (p. R21X, p. I11T and p. W122X) and five novel mutations were identified (p. G27D, p. G74V, p. T134I, p. R308Q and p. I174fs179). The most frequent mutation was the novel p.T134I which was always found in homozygosity, suggesting a founder effect. Patients carrying the p.R308Q mutation had statistically higher residual arginase activity when compared to the other patients, but without a distinct phenotype. The neuroimaging abnormalities were variable degree of cerebral atrophy and/or mild cerebellar atrophy. Brain MRS findings were considered normal.

Relevant data about the natural history and the variability of clinical picture of HA were reported. The clinical features that support the differential diagnosis of cerebral palsy and hereditary spastic paraplegia were described. Neuroimaging findings are nonspecific, and similarly to brain MRS, they do not contribute to the diagnosis of HA. The panel of *ARG1* mutations that cause HA was expanded. A clear genotype-phenotype correlation was not observed in our series.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARG1	enzima arginase I
ARG2	enzima arginase II
<i>ARG1</i>	gene que codifica a enzima arginase I
<i>ARG2</i>	gene que codifica a enzima arginase II
Co	colina
Cr	creatina
DTI	tensor de difusão
EEG	eletroencefalografia
ERM	espectroscopia de prótons por ressonância magnética
GABA	ácido gama-aminobutírico
GLX	glutamina e glutamato
HA	hiperargininemia, doença metabólica da deficiência de arginase I
LC/MS	<i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massa)
mI	mioinositol
MRS	<i>magnetic resonance spectroscopy</i>
MRI	<i>magnetic resonance image</i>
NAA	n-acetil-aspartato
OFC	<i>occipitofrontal circumference</i>
PC	perímetro cefálico
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>

1. INTRODUÇÃO

A paraparesia espástica é um agravo neurológico com alteração da função motora caracterizada por espasticidade nos membros inferiores. Quando ocorre de forma insidiosa e progressiva, a paraparesia espástica pode ser decorrente de várias doenças neurológicas, incluindo os vários tipos de paraparesia espástica hereditária, causadas por mutações genéticas específicas (Fink, 2003; Salinas, Proukakis *et al.*, 2008).

Dentre as várias doenças genéticas que apresentam paraparesia espástica como manifestação durante a infância, a deficiência da arginase, mais conhecida como hiperargininemia (HA), ou muitas vezes denominada apenas argininemia, deve ser lembrada no diagnóstico diferencial por ser uma condição onde é possível oferecer tratamento. A arginase é uma das enzimas que participam do ciclo da ureia, um conjunto de reações responsáveis pela excreção de compostos nitrogenados não utilizados pelo metabolismo do organismo. Esta doença metabólica, descrita em todos os grupos étnicos, causa nível elevado de arginina no sangue que pode ser detectada por exames bioquímicos específicos (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Scaglia e Lee, 2006).

1.1 PREVALÊNCIA E HERANÇA

A incidência ou a prevalência da hiperargininemia não são conhecidas com exatidão. Dentre as doenças do grupo dos distúrbios do ciclo da ureia, a deficiência de arginase é considerada uma das menos frequentes. A incidência estimada de HA é de aproximadamente 1 afetado para cada 2 milhões de nascidos vivos, a partir de um estudo de investigação de distúrbios do ciclo da ureia na população japonesa (Nagata, Matsuda *et al.*, 1991). Outros autores estimaram uma incidência da HA em 1 afetado para 363.000 nascidos vivos a partir de um estudo de distúrbios do ciclo da ureia baseado em dados de frequência no Hospital Johns Hopkins nos EUA (Brusilow e Horwich, 2001).

A hiperargininemia é uma doença com herança autossômica recessiva (OMIM¹ 207800). É comum a descrição de consanguinidade entre os genitores dos afetados e a observação de irmãos afetados na literatura (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997).

¹ Online Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>. Acesso em 10/02/2012.

1.2 HISTÓRICO

O primeiro caso provável de HA foi reportado em 1965 (Peralta Serrano, 1965), mas sem a confirmação da deficiência enzimática, o que ocorreu apenas na documentação da descrição feita por Terheggen e colaboradores de uma família com maior número de afetados no ano de 1970 (Terheggen, Schwenk *et al.*, 1970), segundo a maioria dos autores (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Crombez e Cederbaum, 2005). Vários trabalhos se seguiram na literatura detalhando as alterações clínicas e bioquímicas desta doença, sendo que o gene relacionado à HA foi clonado em 1986 (Dizikes, Grody *et al.*, 1986).

No Brasil, existe apenas um relato de caso publicado de paciente afetado pela HA com o quadro clínico típico da doença no ano de 1997. Nesta publicação, o diagnóstico foi considerado feito tardiamente e foi ressaltada a detecção de uma excreção urinária também aumentada de homocisteína como alteração metabólica associada (Simoni, De Oliveira *et al.*, 1997).

Mesmo considerando a possibilidade de subdiagnóstico desta doença rara, provavelmente existem muitos pacientes com diagnóstico de HA em vários hospitais de centros de referência no Brasil, pois estes já dispõem de condições laboratoriais para a dosagem de arginina há pelo menos 10 anos. Contudo, não há descrição de série de casos ou estudos sobre prevalência desta doença no Brasil.

1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E CURSO DA DOENÇA

Os pacientes com HA, usualmente, manifestam um quadro caracterizado por paraparesia espástica progressiva, déficit cognitivo e epilepsia, geralmente durante a infância, podendo ocorrer outros sinais neurológicos. O quadro clínico habitual da HA é diferente do observado nos outros distúrbios do ciclo da ureia e a ocorrência de episódios de encefalopatia por hiperamonemia é incomum (Prasad, Breen *et al.*, 1997; Scaglia e Lee, 2006; Lee, Jin *et al.*, 2011). Entretanto, alguns casos não tiveram esta apresentação clássica refletindo alguma variabilidade no fenótipo clínico da HA. Já foram descritos casos de apresentação no período neonatal com uma encefalopatia aguda (Braga, Vilarinho *et al.*, 1997; Harrington, Stiefel *et al.*, 2000; Picker, Puga *et al.*, 2003; Jain-Ghai, Nagamani *et al.*, 2011), e de forma ainda mais rara, caso com uma apresentação clínica tardia apenas quando adulto (Cowley, Bowling *et al.*, 1998).

Na forma clássica de apresentação clínica da HA na infância, existe um período de desenvolvimento neuropsicomotor aparentemente dentro da normalidade. Os pacientes são relatados como normais na infância precoce e os primeiros sinais surgem entre 1 a 4 anos de idade. Usualmente, são sinais relacionados à espasticidade de membros inferiores com tropeços, quedas e dificuldade na marcha. Se não tratados, evoluem progressivamente para um quadro de paraparesia espástica. Sinais piramidais são observados clinicamente como hiperreflexia, clônus, sinal de Babinsky e marcha em tesoura e/ou na ponta dos pés. O aumento do tônus, assim como outros sinais piramidais, ocorre inicialmente apenas nos membros inferiores. Os pacientes desenvolvem frequentemente deformidades esqueléticas em tornozelos e joelhos pela grave espasticidade, o que pode levar à perda da capacidade de deambulação. Com a progressão da doença, os pacientes também manifestam espasticidade envolvendo os membros superiores, caracterizando uma tetraparesia espástica. O estudo de condução sensitiva e motora em nervos periféricos pela eletroneuromiografia é normal. Crises epiléticas ocorrem em parte dos casos; são predominantemente do tipo tônico-clônica generalizada e usualmente o quadro de epilepsia é descrito como controlável com uso de medicações. O déficit cognitivo também é observado em praticamente todos os afetados; contribui para a perda da função da linguagem e reforça a impressão de um quadro de regressão neurológica (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006; Cederbaum e Crombez, 2010). Entretanto, o curso da doença pode ser lentamente progressivo e os pacientes afetados podem ser confundidos com aqueles acometidos por uma forma de encefalopatia estática com diplegia espástica ou uma paralisia cerebral (Scheuerle, Mcvie *et al.*, 1993; Prasad, Breen *et al.*, 1997; Lee, Jin *et al.*, 2011).

Na infância, existe o relato de afetados que manifestam sinais de hiperatividade. Não há acometimento visual ou auditivo nos afetados de acordo com o descrito pela literatura. A ocorrência de outros sinais neurológicos como ataxia e distonia também já foi relatada no quadro clínico da HA, aparentemente de forma menos frequente (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Scaglia e Lee, 2006; Cederbaum e Crombez, 2010).

Os pacientes afetados pela HA frequentemente desenvolvem uma intolerância a alimentos ricos em proteínas e apresentam uma restrição espontânea a estes alimentos na sua alimentação. As famílias relatam que as crianças evitam alimentos com grande teor proteico, tais como carnes, ovos, leite e seus derivados, desde o período de lactente. Podem ocorrer sinais de irritabilidade, dificuldade de alimentação ou sonolência quando a dieta com leite de vaca é introduzida. Esta autorrestrrição de ingestão de proteínas pode levar a uma dificuldade

para o diagnóstico por alguns métodos bioquímicos, como a cromatografia de aminoácidos não quantitativa (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Prasad, Breen *et al.*, 1997).

Uma minoria dos pacientes apresenta episódios intermitentes de irritabilidade, náusea, diminuição do apetite e vômitos. Possivelmente, esta manifestação seria secundária a períodos de hiperamonemia, como presente nos outros distúrbios do ciclo da ureia (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Scaglia e Lee, 2006). Estes episódios raramente evoluem para letargia. Hepatomegalia ocorre apenas durante os episódios infrequentes de hiperamonemia e raros casos com alteração na função hepática foram descritos (Crombez e Cederbaum, 2005). Existem casos de pacientes com quadro clínico clássico que sofreram episódios agudos de hiperamonemia e evoluíram para coma e/ou morte em idade mais avançada (Grody, Kern *et al.*, 1993; Prasad, Breen *et al.*, 1997; Cederbaum e Crombez, 2010).

Outro dado relevante é a variabilidade da gravidade e do curso dos sinais neurológicos da doença, mesmo entre irmãos afetados. Já foram citados pacientes com HA que alcançaram a vida adulta e até mesmo a velhice, o que parece indicar que a sobrevida mais prolongada é possível com tratamento adequado (Prasad, Breen *et al.*, 1997; Crombez e Cederbaum, 2005).

Alguns autores reportam que ocorrência de déficit de crescimento é uma complicação presente em praticamente todos os pacientes (Crombez e Cederbaum, 2005; Cederbaum e Crombez, 2010), apesar de outros trabalhos relatarem esta complicação de forma menos frequente (80% dos pacientes) e da existência de vários pacientes com altura normal (Prasad, Breen *et al.*, 1997). Microcefalia já foi descrita em parte dos pacientes com HA. Em um trabalho de revisão, a microcefalia foi observada em torno de 40% dos afetados (Prasad, Breen *et al.*, 1997); mas a frequência deste sinal clínico não é claramente determinada em outros estudos (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Scaglia e Lee, 2006).

O quadro de epilepsia também é uma complicação importante. A maioria dos autores ressalta que as crises epiléticas não estão associadas a episódios de hiperamonemia. Os trabalhos com descrição de série de casos de HA referem-se a uma frequência de 60% (33 de 55 pacientes) e 62% (16 de 26 pacientes) de ocorrência de crises epiléticas (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Prasad, Breen *et al.*, 1997). As manifestações epiléticas mais frequentes foram do tipo tônico-clônica generalizada, mas crises parciais focais, crises parciais com generalização, crises de ausência e crises tônicas generalizadas também foram descritas (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Scaglia e Lee, 2006). Existe descrição de pacientes com manifestação inicial da epilepsia como um estado de mal epilético de crises tônico-clônicas generalizadas ('status epilepticus') (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997). O estudo

eletroencefalográfico (EEG) dos pacientes com HA é descrito como frequentemente alterado. Os principais achados do EEG são a lentificação difusa do ritmo de base e grafoelementos epileptiformes (Scaglia e Lee, 2006). Um estudo de revisão de casos apontou a ocorrência de alterações eletroencefalográficas numa frequência de 95% (20 de 21 pacientes) (Prasad, Breen *et al.*, 1997). De uma forma um tanto imprecisa, alguns autores mencionam a frequência de mais de 50% dos casos de pacientes com EEG alterado (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997).

1.4 NEUROIMAGEM

Existem poucos estudos de neuroimagem em afetados pela HA, especialmente nos casos de apresentação clássica na infância. Exames de neuroimagem mostram principalmente atrofia cerebral e/ou cerebelar (Scaglia e Lee, 2006; Gungor, Akinci *et al.*, 2008). A depender da idade do paciente e do tempo de manifestação da doença, a avaliação por imagem do sistema nervoso central pode ser normal (Jain-Ghai, Nagamani *et al.*, 2011). Alguns outros achados da ressonância magnética são considerados inespecíficos e com pouco valor diagnóstico, tais como pequenas áreas de hipersinal na ponderação T2 na substância branca periventricular (Scaglia e Lee, 2006).

Recentemente, um trabalho utilizando tensor de difusão (DTI), uma técnica de aquisição de imagem por ressonância magnética, revelou alterações no trato corticoespinhal que podem refletir o mecanismo de lesão do sistema nervoso central da doença. No entanto, esta técnica foi aplicada, até o momento, em um único paciente (Oldham, Vanmeter *et al.*, 2010).

O estudo de espectroscopia de prótons por ressonância magnética (ERM) já foi realizado em alguns pacientes com quadro atípico de apresentação aguda no período neonatal da HA. A ERM mostrou aumento de glutamina/glutamato em dois relatos de caso, como também já observado em pacientes com os outros distúrbios do ciclo da ureia (Choi e Yoo, 2001; Picker, Puga *et al.*, 2003; Jain-Ghai, Nagamani *et al.*, 2011). Apenas um trabalho avaliou possíveis alterações em pacientes com quadro clássico de HA por ERM. Este estudo limitou-se somente a dois irmãos afetados com HA e sugeriu a ocorrência de um pico anormal em 3,8 ppm que poderia representar deposição de arginina no tecido cerebral (Gungor, Akinci *et al.*, 2008).

1.5 ANORMALIDADES BIOQUÍMICAS

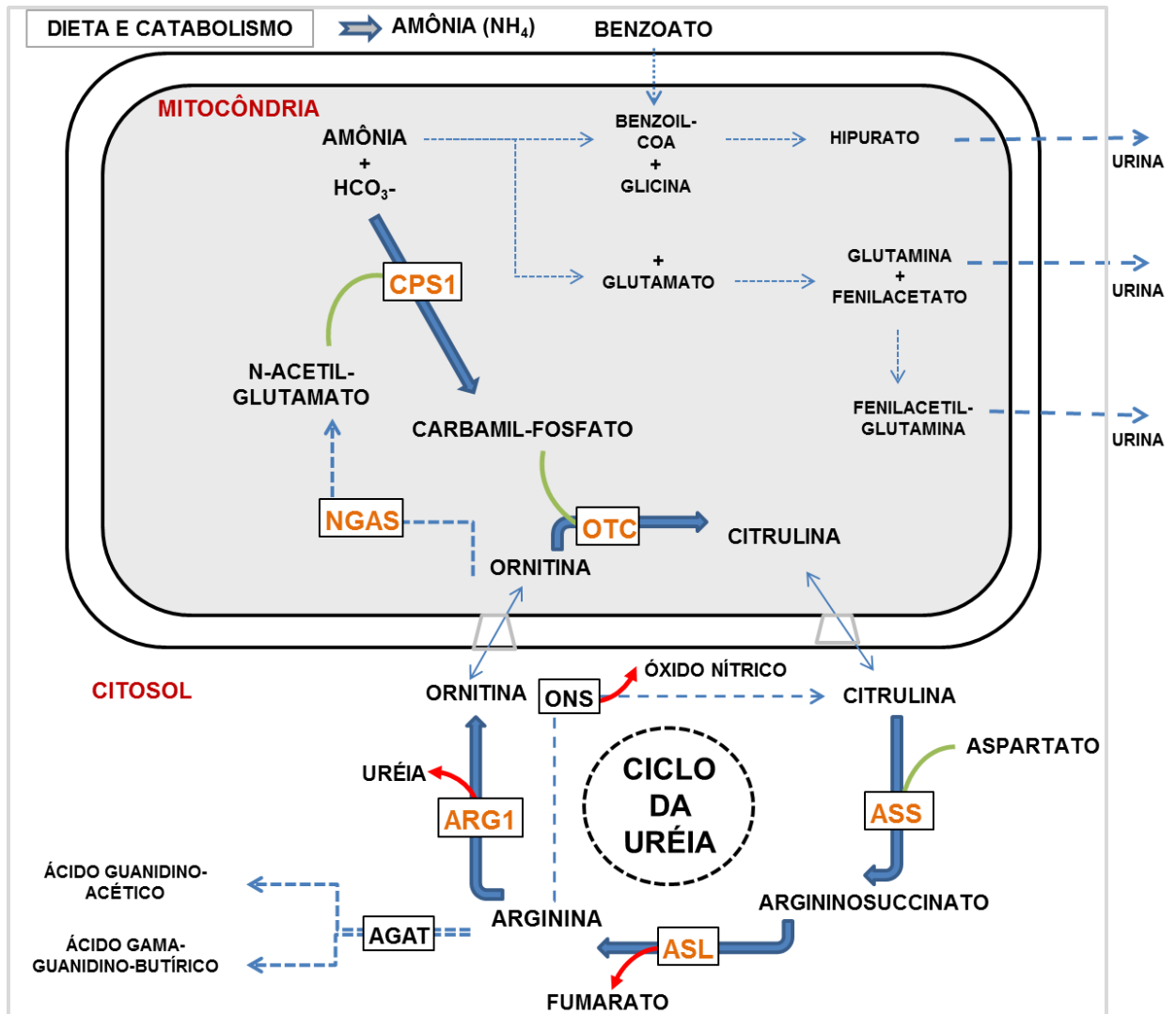
O ciclo da ureia é a principal via metabólica responsável pela eliminação do nitrogênio excedente, presente na amônia, que é produzida pelo metabolismo dos aminoácidos. A amônia é convertida em ureia, produto de menor toxicidade. A degradação e a síntese *de novo* da arginina também estão envolvidas neste conjunto de reações bioquímicas do ciclo da ureia (Figura 1). As seis enzimas que formam o ciclo da ureia são expressas, principalmente, nas células hepáticas periportais. A arginase é uma destas seis enzimas, a última antes da formação da ureia, e responsável pela hidrólise da arginina em ureia e ornitina (Brusilow e Horwich, 2001).

O acúmulo de arginina é a anormalidade bioquímica que marca a deficiência de arginase e esta alteração bioquímica é detectada em todos os afetados. Os níveis de arginina no sangue aumentam de 5 até 15 vezes em relação aos valores normais (10 – 140 $\mu\text{mol/L}$) e até 10 vezes em líquido (13 – 35 $\mu\text{mol/L}$) nos pacientes com ingestão normal de proteínas. Deve ser lembrado, para se evitar erros de diagnóstico em alguns lactentes normais, que pode ocorrer elevação de arginina em plasma até 2 vezes o valor de referência sem que haja deficiência da arginase. A elevação de ácido orótico na urina é frequentemente observada na HA. Aminoacidúria dibásica por competição com arginina nos túbulos proximais é constatada secundariamente e pode ser o primeiro achado laboratorial da HA. Pode ocorrer ainda uma elevação dos níveis de glutamina/glutamato no sangue e/ou líquido (Cederbaum, Shaw *et al.*, 1979; Brusilow e Horwich, 2001; Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006). Os níveis de ureia em sangue (valores de referência: 15 – 30 mg/dl) podem estar reduzidos na HA como observado nos demais defeitos enzimáticos do ciclo da ureia. Entretanto, os valores usualmente observados na HA não estão tão diminuídos como nas outras doenças (Cederbaum, Shaw *et al.*, 1979; Scaglia e Lee, 2006).

A literatura sobre HA descreve algumas alterações em outros exames laboratoriais, usualmente sem repercussão clínica para os afetados, também observados nos outros distúrbios do ciclo da ureia e possivelmente relacionadas a uma disfunção hepática. Pode ocorrer elevação das transaminases e alterações em provas de coagulação, como aumento do tempo de protrombina (Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006).

Vários compostos guanidínicos derivam diretamente da arginina e já foram confirmados como aumentados nos pacientes com HA (Marescau, De Deyn *et al.*, 1990; Crombez e Cederbaum, 2005).

FIGURA 1. Representação do ciclo da ureia, com as enzimas (laranja) que deficientes provocam doenças deste grupo, metabólitos envolvidos, as vias metabólicas alternativas de depuração da amônia e alguns metabólitos derivados da arginina.



LEGENDA:

ARG1 (arginase I) – hiperargininemia

OTC (ornitina transcarbamilase) – deficiência de OTC

ASS (argininosuccinato sintase) – citrulinemia tipo I

ASL (argininosuccinato liase) – acidúria argininosuccínica

NAGS (N-acetilglutamato sintase) – deficiência de NAGS

CPS1 (carbamilfosfato sintase I) – deficiência de CPS

ONS (óxido nítrico sintase)

AGAT (arginina:glicina amidinotransferase)

As crises metabólicas com hiperamonemia, usualmente observadas nos outros distúrbios do ciclo da ureia, raramente ocorrem na HA. Os níveis de amônia no sangue estão usualmente dentro dos valores normais (valores de referência: 13 – 40 mg/dl) quando os pacientes estão fora de crise. Nos momentos que ocorre um valor aumentado de amônia no sangue, este não é tão elevado durante as crises na HA como observado nos outros distúrbios do ciclo da ureia, quando usualmente a hiperamonemia nestas doenças ultrapassa 150 mg/dl. (Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006).

Uma possível explicação para esta diferença foi indicada com a identificação de uma segunda isoenzima da arginase. Esta é uma enzima mitocondrial denominada arginase II. A enzima arginase II é expressa em maior quantidade em outros tecidos, predominantemente nos rins, e seu nível chega a aumentar 40 vezes em condições de hiperamonemia quando a atividade da arginase I citosólica do fígado é deficiente (Spector, Rice *et al.*, 1983; Grody, Argyle *et al.*, 1989; Grody, Kern *et al.*, 1993; Cederbaum, Yu *et al.*, 2004). Alguns autores inferem que o curso mais lento do quadro típico da HA, quando comparado aos outros distúrbios do ciclo da ureia, poderia ser causado pela atividade desta segunda isoenzima (Crombez e Cederbaum, 2005).

Um aspecto importante é que o diagnóstico da HA pode ser dificultado pelo fato dos afetados desenvolverem uma autorrestrrição de ingestão de proteínas. Isto pode interferir na detecção do aumento da arginina em plasma pela cromatografia (qualitativa ou quantitativa) que poderia apresentar resultados normais ou com elevação limítrofe. Por esta razão, quando existe a suspeita de HA, a dosagem sérica da arginina deve ser feita após um período de dieta normoproteica, pouco aconselhável pelo risco que isto representa ao paciente, ou o diagnóstico deve ser confirmado, preferencialmente, pela determinação da atividade da arginase I (Prasad, Breen *et al.*, 1997; Cederbaum e Crombez, 2010).

A atividade da arginase tipo I, denominada mais frequentemente apenas arginase, pode ser medida em hepatócitos, e de forma mais prática e conveniente, em eritrócitos. Existe boa correlação entre a atividade enzimática medida nas hemácias e a obtida em hepatócitos. A maioria dos afetados tem atividade menor do que 5% da verificada em controles normais (Scaglia e Lee, 2006; Cederbaum e Crombez, 2010). Entretanto, um trabalho de revisão descreveu dois afetados com atividade residual maior em torno de 30% (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997). Até o presente momento, nunca foram associados à deficiência da arginase II qualquer quadro de manifestação clínica ou ainda a detecção de elevação de arginina em plasma (Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006; Cederbaum e Crombez, 2010).

1.6 FISIOPATOLOGIA

Estudos de autópsia em alguns pacientes com HA não revelaram qualquer anormalidade consistente que pudesse ser associada ao defeito enzimático primário. A observação dos estudos anatomopatológicos cerebrais confirmou a atrofia cerebral detectada nos exames de imagens, mas sem outra anormalidade específica. Biópsia hepática realizada em período de crise de hiperamonemia mostrou apenas hepatócitos distendidos, mas sem outras alterações significativas (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Crombez e Cederbaum, 2005).

A espasticidade significativa da HA não é usualmente observada nos outros distúrbios do ciclo da ureia. A patogênese das manifestações neurológicas na HA ainda não está completamente esclarecida. A maioria dos autores desconsidera o papel da hiperamonemia na fisiopatologia da HA. A manifestação de crises epiléticas não é influenciada pelos níveis de amônia. A elevação intermitente da amônia no sangue (usualmente menor que 150 mg/dl) justifica os episódios de irritabilidade, anorexia e vômitos dos pacientes com HA. Entretanto, a gravidade ou a progressão do quadro neurológico da HA não se correlacionam com a hiperamonemia (Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006).

Alguns pacientes, que foram diagnosticados e tratados desde o nascimento por dieta com restrição proteica e suplementação de aminoácidos essenciais, permanecem assintomáticos na vida adulta (Cederbaum, Yu *et al.*, 2004). Por outro lado, alguns pacientes com deficiência de arginase e que apresentavam níveis normais de amônia pela restrição proteica, mas com níveis aumentados de arginina de forma persistente (acima de 600 $\mu\text{mol/L}$), não tiveram melhora em relação ao quadro clínico da doença. Estes dados sugerem que as complicações neurológicas poderiam resultar do acúmulo crônico de arginina ou de algum dos seus metabólitos (Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006).

Entretanto, não se sabe ainda como a arginina ou alguns de seus metabólitos poderiam provocar o processo neurotóxico. Vários compostos guanidínicos são encontrados em concentração aumentada nos pacientes com HA e é conhecido que o acúmulo de alguns destes compostos podem causar desmielinização (Scaglia e Lee, 2006; Deignan, De Deyn *et al.*, 2010). A arginina pode ser precursora de glutamato e GABA, o que poderia fazer cogitar em uma interferência na neurotransmissão via GABA e glutamato, levando à lesão cerebral causada por mecanismo de ação excitatória. A arginina também é precursora de óxido nítrico, o que também faz especular que uma síntese aumentada de óxido nítrico poderia causar uma

lesão oxidativa como mecanismo fisiopatológico da doença. Ou ainda, deve ser considerada a possibilidade da somatória destes mecanismos como causa do processo neuropatológico da HA (Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006).

1.7 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

A hiperargininemia é causada por diferentes tipos de mutações no gene *ARG1*, localizado na região cromossômica 6q23, que sintetiza a enzima arginase I. Este gene codifica uma cadeia polipeptídica composta de 322 aminoácidos. A enzima arginase I (ARG1) é encontrada sob uma forma de homotrímero desta cadeia, sendo que cada subunidade contém um sítio catalítico. Esta enzima é codificada em grande quantidade no fígado e nos eritrócitos, sendo que as formas encontradas nos hepatócitos e nas hemácias são consideradas idênticas (Grody, Klein *et al.*, 1992; Brusilow e Horwich, 2001).

Mutações de troca de sentido (*missense mutation*) são mais prevalentes e ocorrem em regiões bastante conservadas evolutivamente do gene *ARG1*. As mutações sem sentido (*nonsense mutation*) e pequenas deleções foram encontradas em uma menor proporção dos pacientes e dispersas pelos oito éxons codificantes do gene *ARG1* (Uchino, Haraguchi *et al.*, 1992; Vockley, Tabor *et al.*, 1994; Uchino, Snyderman *et al.*, 1995; Vockley, Goodman *et al.*, 1996; Ash, Scolnick *et al.*, 1998; Cederbaum e Crombez, 2010). Já foi estudado o mecanismo pela qual algumas mutações mais frequentes prejudicam o funcionamento da enzima arginase I (Ash, Scolnick *et al.*, 1998).

Mutações no gene *ARG1* já foram descritas em diferentes populações (Hertecant, Al-Gazali *et al.*, 2009; Jain-Ghai, Nagamani *et al.*, 2011; Lee, Jin *et al.*, 2011). Em um estudo de investigação realizado em quatro afetados portugueses, foi identificada a mutação de ponto levando a códon de parada (p.R21X) em homozigose em todos os pacientes, o que sugeriu um possível efeito fundador desta mutação nesta população (Cardoso, Martins *et al.*, 1999).

Outro gene *ARG2* codifica a isoenzima arginase II (ARG2) e está localizado na região cromossômica 14q24. Esta isoenzima, com uma cadeia polipeptídica de 355 aminoácidos, apresenta localização mitocondrial e não se expressa no fígado, tendo expressão em diferentes tecidos: rins, próstata, trato gastrointestinal e cérebro. O gene *ARG2* parece ser ancestral do gene *ARG1* e as cadeias de aminoácidos sintetizadas por estes genes apresentam 50% de homologia. Apesar da função da ARG2 não ser completamente conhecida, a enzima parece estar envolvida com outras funções de biossíntese como no metabolismo do óxido

nítrico (Vockley, Jenkinson *et al.*, 1996; Iyer, Jenkinson *et al.*, 1998; Cederbaum, Yu *et al.*, 2004).

Todos os casos descritos de HA foram provocados por mutações apenas no gene *ARG1* e nenhum outro gene foi envolvido como possível causa da doença. Nenhuma clara relação genótipo-fenótipo foi estabelecida com segurança até o momento (Crombez e Cederbaum, 2005; Cederbaum e Crombez, 2010).

Um modelo ‘*knockout*’ em camundongo do gene *ARG2* foi obtido em 2001. Os animais com mutação em homozigose tinham níveis aumentados de arginina, quando comparados aos animais selvagens, mas o fenótipo era normal. Outro modelo animal ‘*knockout*’ para o gene *ARG1* foi conseguido em 2002. O nível de arginina nestes animais era quatro vezes o valor de referência. O nível de RNA mensageiro de *ARG1* foi praticamente nulo e nenhuma proteína *ARG1* foi detectada. Os animais mutantes eram comparativamente pequenos e morreram em torno de 12 dias de vida por hiperamonemia (Shi, Morris *et al.*, 2001; Iyer, Yoo *et al.*, 2002; Scaglia e Lee, 2006).

1.8 TRATAMENTO

Vários trabalhos descrevem a experiência de tratamento de pacientes com HA (Qureshi, Letarte *et al.*, 1984; Lambert, Marescau *et al.*, 1991; Prasad, Breen *et al.*, 1997). A hiperargininemia é considerada uma doença metabólica que pode responder ao tratamento dietético, principalmente se iniciado precocemente e controlado rigorosamente, embora ainda seja incerta sua eficácia para evitar a progressão da espasticidade (Cederbaum, Moedjono *et al.*, 1982; De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Scaglia e Lee, 2006; Edwards, Moseley *et al.*, 2009).

O tratamento iniciado ao nascimento pode ter um razoável sucesso, sem sequelas até a vida adulta, segundo o acompanhamento relatado de pelo menos um paciente (Snyderman, Sansaricq *et al.*, 1979; Crombez e Cederbaum, 2005). Isto é possível especialmente em irmãos de pacientes já diagnosticados. Na experiência de alguns autores, pelo menos quatro pacientes, com diagnóstico precoce e tratamento dietético rigoroso desde os primeiros dias de vida, evoluíram sem manifestações neurológicas até os 30 anos de vida (Cederbaum, Yu *et al.*, 2004; Edwards, Moseley *et al.*, 2009). Entretanto, os principais centros que relatam o acompanhamento dos pacientes com HA ressaltam a dificuldade de aderência ao tratamento e a impossibilidade de garantir uma boa resposta ao tratamento para os afetados. A maioria dos autores menciona que o tratamento pode controlar as manifestações decorrentes das crises de

hiperamoniemia, e pode interromper a progressão do comprometimento neurológico. Deve ser destacado que o tratamento não melhora as lesões cerebrais e as manifestações secundárias já presentes no início do tratamento (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Crombez e Cederbaum, 2005; Cederbaum e Crombez, 2010).

O tratamento da HA deve focar os seguintes aspectos: (1) dieta hipoproteica com ingestão de quantidade mínima de proteínas; (2) suplementação com uso de fórmulas especiais sem arginina e contendo os aminoácidos essenciais; e (3) uso de drogas que promovam o desvio de amônia por vias metabólicas alternativas ao ciclo da ureia, para remoção do nitrogênio, como benzoato de sódio e fenilbutirato de sódio. De maneira desejável, a ingestão de proteína deve ser a menor possível para evitar o catabolismo proteico, manter a concentração normal dos outros aminoácidos e preservar o crescimento. Estima-se que metade do aporte de proteínas deva ser oferecida por fórmulas dietéticas isentas de arginina. Para a maioria dos pacientes, é muito difícil a aderência a uma dieta suficientemente rigorosa para atingir os níveis de arginina próximos ao normal (Iyer, Jenkinson *et al.*, 1998; Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006; Cederbaum e Crombez, 2010).

Parte dos pacientes que aderiram ao tratamento dietético apresentam progressão da espasticidade de membros inferiores, mesmo com o tratamento adequado (Crombez e Cederbaum, 2005). Em estudo de revisão da literatura de 1997, de 11 pacientes onde havia informação sobre o efeito do tratamento, quatro tiveram progressão da espasticidade, embora não tenha sido relatada qual a gravidade das manifestações ao diagnóstico ou a idade de início do tratamento (Prasad, Breen *et al.*, 1997).

Nos episódios agudos de hiperamoniemia, os pacientes devem ser tratados como nos outros distúrbios do ciclo da ureia, embora estes episódios costumem ser mais transitórios e de mais fácil controle. Este tratamento pode incluir: (1) redução do excesso de nitrogênio da dieta por restrição de proteínas e inibição do catabolismo proteico através de aporte elevado de calorias como o uso parenteral de glicose; (2) redução de amônia por diálise; e (3) uso endovenoso de fenilacetato e benzoato de sódio (Brusilow e Horwich, 2001; Cederbaum e Crombez, 2010).

O descontrole do quadro epiléptico pode influenciar inclusive no desempenho cognitivo e agravar o comprometimento neurológico na HA. Além do controle adequado da epilepsia, existem outras medidas que devem ser consideradas no manejo dos pacientes com HA. Como a espasticidade em membros inferiores costuma ser grave e pode progredir apesar do tratamento para a doença de base, deve ser avaliado individualmente o benefício do uso de toxina botulínica, de procedimentos ortopédicos de liberação tendínea, e do uso de

medicações para atenuar a espasticidade (Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006; Cederbaum e Crombez, 2010).

1.9 DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL E TRIAGEM NEONATAL

A hiperargininemia é uma doença genética com risco de 25% de recorrência para o casal com um filho afetado. Nos últimos anos, já está sendo oferecido o recurso do diagnóstico pré-natal, seja pela detecção de mutações no gene *ARG1* em vilosidades coriônicas ou amniócitos, ou ainda pela dosagem de arginase em eritrócitos fetais a partir da cordocentese (Hewson, Clarke *et al.*, 2003; Korman, Gutman *et al.*, 2004; Landsverk, Wang *et al.*, 2011).

A oportunidade do diagnóstico precoce da HA pela triagem neonatal já é uma realidade em muitos países, uma vez que o nível de arginina aumentado pode ser detectado pelo método de espectrometria de massa a partir de amostras de sangue em papel-filtro. Contudo, o aprofundamento das pesquisas permitirá estabelecer a sensibilidade deste método para a detecção de HA em termos populacionais, considerando-se que alguns afetados podem ser perdidos caso a coleta seja realizada muito precocemente no período neonatal (Scaglia e Lee, 2006; Gomes Martins, Santos Silva *et al.*, 2011).

2. MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

A hiperargininemia é uma doença ainda pouco conhecida pela maioria dos profissionais da saúde e sua história natural não está ainda completamente caracterizada. Por se tratar de uma doença pouco frequente, quase todas as publicações abrangem relatos de casos isolados, série de casos com número pequeno de pacientes (a maior com sete casos) ou revisão de casos de vários centros ou dos casos já publicados. Deveria ser uma condição diagnosticada o mais precocemente possível entre pacientes com paraparesia espástica, pois se trata de uma das poucas doenças com este quadro clínico e a qual se pode oferecer tratamento (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Prasad, Breen *et al.*, 1997; Salinas, Proukakis *et al.*, 2008).

Alguns aspectos da HA ainda não foram claramente abordados e permanecem alguns questionamentos após a revisão da literatura sobre esta doença metabólica. Um aspecto não esclarecido é se a urgência urinária também ocorre na HA, assim como observado em outras formas de paraparesia espástica hereditária de causa genética. As frequências de algumas complicações, como o déficit de crescimento, e de sinais clínicos, como a microcefalia, ainda não foram bem definidos na HA. Também não foi confirmada a presença de alterações na espectroscopia de prótons que possam auxiliar no diagnóstico desta doença metabólica em outros pacientes afetados pela HA.

Não há estudos sobre HA na população brasileira. Uma revisão no banco de dados de prontuários de pacientes atendidos na Rede SARAHE de Hospitais de Reabilitação, até o ano de 2010, indicou possibilidade desta doença em 24 destes pacientes, por apresentarem, laboratorialmente, aumento de arginina na cromatografia qualitativa de aminoácidos em camada delgada. O estabelecimento de exames mais específicos para confirmação diagnóstica da HA em um centro de referência facilitaria o tratamento dos afetados e o aconselhamento genético aos familiares. Também permitiria formar um grupo de pacientes brasileiros para investigação de alguns aspectos desta doença: (1) se a forma de apresentação clínica da HA é a mesma descrita nas outras populações estudadas; (2) se a mesma mutação recorrente p.R21X no gene *ARG1* é a principal responsável por causar a doença na população brasileira, considerando a ancestralidade portuguesa na formação miscigenada dos brasileiros; (3) se existem novas mutações no gene *ARG1* ainda não reportadas na literatura em nossa população.

3. OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram: (1) avaliação dos aspectos clínicos da hiperargininemia em uma amostra da população de pacientes brasileiros atendidos pela Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação e (2) investigação das mutações no gene *ARG1* que causam a hiperargininemia nesta população e de correlações entre o genótipo e o fenótipo da doença.

Os objetivos secundários deste estudo foram: (1) investigar anormalidades por estudo de ressonância magnética do encéfalo e espectroscopia de prótons que sejam consistentes e relacionadas com a hiperargininemia e (2) avaliar as alterações eletroencefalográficas nesta população com hiperargininemia.

4. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo observacional transversal que utilizou uma amostra de conveniência, obtida a partir da casuística de um hospital de referência.

4.1 GRUPO AMOSTRAL E ASPECTOS ÉTICOS

Foram avaliados 16 pacientes que mantinham acompanhamento ambulatorial na Rede SARAHA de Hospitais de Reabilitação e com disponibilidade de acesso para obtenção de dados clínicos e de material biológico (sangue periférico).

A abordagem dos pacientes foi realizada pelo pesquisador responsável na Unidade SARAHA-Brasília e pelo médico assistente responsável pelo paciente nas outras Unidades da Rede. Após a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Rede SARAHA de Hospitais de Reabilitação (Anexo 1), os responsáveis legais dos pacientes receberam uma explicação compreensível sobre os objetivos deste estudo e todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

4.2 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS

Todos os pacientes com HA incluídos no estudo tiveram seus dados clínicos revisados de duas formas: (1) preenchimento de uma ficha clínica (Anexo 3) pelo médico assistente para busca de informações clínicas específicas e (2) revisão, pelo pesquisador, das informações disponíveis em prontuário eletrônico da Rede SARAHA de Hospitais de Reabilitação.

4.3 DOSAGEM QUANTITATIVA DE AMINOÁCIOS EM SANGUE

A dosagem foi realizada por espectrometria de massa utilizando o *kit aTRAQ amino acid* (AB Sciex, Foster City, CA, EUA) no equipamento *API 3200TM LC/MS system* (AB Sciex). Foram utilizados os parâmetros de acordo com o fabricante do kit. Como controle, foi realizada a dosagem em 15 indivíduos normais, pareados pela idade e sexo.

4.4 DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ARGINASE EM ERITRÓCITOS

Através de método de colorimetria, foi realizada a dosagem quantitativa da atividade de arginase em eritrócitos através do *QuantiChrom™ Arginase Assay Kit DARG-200* (BioAssay Systems, Hayward, CA, EUA), seguindo as recomendações e instruções do fabricante. Para garantir a eficiência do teste, foi necessário evitar a hemólise. Para isso, foi fundamental a refrigeração em todas as etapas desta metodologia, desde a coleta na obtenção das amostras de concentrado de hemácias. Como controle, foi realizada a dosagem em 45 indivíduos normais, pareados pela idade e sexo.

4.5 INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *ARG1*

O DNA genômico foi extraído a partir de leucócitos obtidos de sangue total, conforme a técnica de precipitação salina modificada. Este material biológico foi armazenado à temperatura de 4° C. Foi realizado sequenciamento direto da região codificante do gene *ARG1* pela técnica de Sanger. As reações de PCR para o sequenciamento foram feitas utilizando os *primers* que flanqueiam os éxons do gene. O produto de PCR purificado foi sequenciado utilizando-se o *Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram analisadas no sistema ABI 3130xl (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados utilizando o *software SeqScape v2.5* (Applied Biosystems) e comparados com a sequência do gene *ARG1* humano obtida no banco de dados do *GenBank* (RefSeq NG_007086.2) do NCBI². Para confirmar as mutações novas identificadas, várias análises por ferramentas de bioinformática foram realizadas. Foi utilizado o programa ‘CLUSTALW2’ para alinhamento da sequência observada na cadeia de aminoácidos da *ARG1* de outros organismos. Outros programas disponíveis na rede, como ‘nsSNPAnalyzer’, ‘SNAP’ e ‘SNPs3D’, também foram usados para estimar o efeito deletério das mutações. Para estudar o impacto das mutações na estabilidade da proteína *ARG1* foi utilizada a ferramenta do programa FoldX.

² National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 15/03/11.

4.6 IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E ESPECTROSCOPIA DE PRÓTONS (ERM)

Como alguns pacientes não tiveram condições clínicas e/ou comportamentais para realização de exame sem sedação, foram obtidas imagens de um menor número de pacientes desta série de casos. Dez pacientes foram submetidos ao exame de ressonância magnética do encéfalo em aparelhos de 1,5T e de 3T nos sistemas *Siemens Magnetom Vision* (Siemens, Erlangen, Alemanha) ou *GE Signa MR* (GE Healthcare, Milwaukee, EUA), ao longo do seu acompanhamento ambulatorial. As sequências foram avaliadas em pelo menos dois planos ponderados em T1, T2, difusão e FLAIR (*fluid attenuated inversion recovery*). Todas as imagens foram analisadas na busca de anormalidades por dois radiologistas com pelo menos cinco anos de experiência e discrepâncias na avaliação foram resolvidas por consenso.

O estudo de espectroscopia do encéfalo foi realizado conforme parâmetros apresentados pelo único trabalho de referência (Gungor, Akinci *et al.*, 2008), com técnica uni-voxel, em seis pacientes acompanhados na Unidade SARA-H-Brasília que colaboram para realização do exame sem sedação. O voxel de 8 ml foi colocado na substância branca aparentemente normal do lobo parietal direito e no líquido. Os picos resultantes da curva foram analisados pela razão entre os metabólitos, sendo considerado o metabólito creatina (Cr) como denominador. A creatina é escolhida por ser relativamente estável, mesmo nos processos patológicos. Os metabólitos considerados padrão (n-acetil-aspartato – NAA, colina – Co, creatina – Cr, glutamina e glutamato – GLX e mioinositol – mI) e eventuais picos anômalos foram incluídos na análise.

4.7 ELETROENCEFALOGRAMA (EEG)

Todos os pacientes realizaram pelo menos uma única vez o registro de EEG em repouso durante 30 minutos. Foi utilizado equipamento padrão com 20 canais, processador de 12 bits, taxa de amostragem de 512 Hz e montagem obedecendo ao Sistema Internacional 10-20. Foram realizados procedimentos de ativação de rotina: estimulação fótica intermitente e hiperventilação (nos pacientes cooperativos). O exame de EEG foi indicado durante o acompanhamento ambulatorial dos afetados, mesmo em uso de anticonvulsivantes.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerando o tamanho da amostra estudada, foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparar a atividade residual da arginase em eritrócitos entre os grupos de pacientes com diferentes genótipos de mutações do gene *ARG1*.

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são demonstrados sob a forma de três manuscritos que foram elaborados para publicação em três periódicos diferentes incluídos a seguir.

ARTIGO 1**The clinical features and neurological progression of hyperargininemia.**

The clinical features and neurological progression of hyperargininemia.

Authors:

Daniel R Carvalho ^{*,#}, MD, MSc

Jaime M Brum ^{*}, MD, PhD

Carlos E Speck-Martins ^{*}, MD, PhD

Fabrcio D Ventura ^{*}, MD

Mônica M M Navarro ^{*}, MD

Kátia E F A Coelho ^{*}, MD

Dalton Portugal ^{*}, MD

Riccardo Pratesi [#], MD, PhD

* SARA H Network of Rehabilitation Hospitals, Brazil.

Post-graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Brasilia University, Brasilia, DF, Brazil.

Running title: The clinical features of hyperargininemia.

Corresponding author: Dr. Daniel R. Carvalho, Genetic Unit, SARA H Rehabilitation Hospital, SMHS Quadra 501 Conj. A, Brasilia-DF, 70335-901, Brazil. Tel.: +55-61-3319-1111; fax: +55-61-3319-1538; e-mail: danielcarvalho@sarah.br.

ABSTRACT

Hyperargininemia is an autosomal recessive metabolic disorder caused by a deficiency of the enzyme arginase I. It is a rare pan-ethnic disease with a clinical presentation that is distinct from that of other urea cycle disorders, and hyperammonemic encephalopathy is not usually observed. Hyperargininemia is one of the few treatable causes of spastic paraparesis in childhood, and it can be confused with cerebral palsy. We retrospectively evaluated the clinical onset, neurologic manifestations, progression of signs, electroencephalographic abnormalities and laboratory findings of 16 Brazilian patients with hyperargininemia. Relevant data about the clinical spectrum and natural history of hyperargininemia are detailed. Progressive spastic diplegia is the key clinical abnormality observed in this group, but variability of the clinical presentation and progression was noted in our series. Seizures in hyperargininemia may be more common than has been reported in previous studies. The features that distinguish hyperargininemia from cerebral palsy and hereditary spastic paraplegia are emphasized in this large series of patients.

INTRODUCTION

Hyperargininemia (arginase deficiency; argininemia; Mendelian Inheritance in Man #207800) is one of the few treatable causes of spastic paraparesis in childhood [1]. Hyperargininemia is a rare autosomal recessive metabolic disorder caused by the deficiency of the enzyme arginase I (ARG1), the final enzyme of the urea cycle that catalyzes the conversion of arginine to urea plus ornithine [2]. The disease is pan-ethnic and has an estimated incidence of 1 in 2 million live births. Arginase I is encoded by the gene *ARG1*, located on chromosome 6q23 and is the only gene associated with hyperargininemia. The main biochemical abnormality of hyperargininemia is an increased arginine level in blood and other fluids [3].

The common phenotype is quite distinct from that of other urea cycle disorders, and hyperammonemic encephalopathy is uncommon. The clinical onset typically begins later in infancy, after apparently normal psychomotor development [2-5]. Phenotypic variability is also observed in hyperargininemia: an acute, severe neonatal or early onset presentation similar to the other urea cycle disorders and a rare adult-onset clinical presentation have been described [6-8].

The tendency for patients with hyperargininemia to develop spastic diplegia suggests a specific pathogenic mechanism in the brain [3, 4, 9]. The neuropathogenic mechanism of hyperargininemia is not yet completely understood. Some metabolites of arginine, such as guanidine compounds and nitric oxide, may cause damage to the brain development from their neurotoxic effects [2, 3, 10].

Almost all patients manifest an insidious onset of spastic paraplegia, cognitive deficiency and epilepsy in childhood. Because of the slow progression of signs, the typical presentation of hyperargininemia can be mistaken for cerebral palsy [1, 9, 11]. Ataxia and dystonia have been observed in a few patients [2-4]. Because hyperargininemia is a very rare disease and

only a few series of patients have been reported in the literature, the clinical course of hyperargininemia is still poorly characterized.

We evaluated 16 Brazilian patients with hyperargininemia who were not diagnosed by newborn screening. We retrospectively studied the clinical onset, neurologic manifestations, progression of signs, electroencephalographic abnormalities and laboratory findings in these patients. Here, we report data on the clinical spectrum and natural history of hyperargininemia in our series of patients.

STUDY DESIGN AND METHODS

Patients

The patients from 4 geographic regions of Brazil were assessed in a network of tertiary public hospitals that treat neurological diseases and disturbances in gait. This retrospective study was approved by the Institutional Review Board. Informed consent was obtained from the legal guardian of all participants. All patients were evaluated by our rehabilitation program for neurologic complications. Initially, they were screened by thin layer chromatography of plasma amino acids. The diagnosis of hyperargininemia was confirmed using 3 criteria: (1) very low or absent arginase I activity in erythrocytes; (2) blood arginine level measured by mass spectrometry that was at least 3 times higher than the mean level of the controls; and (3) identification of mutant alleles of *ARG1* gene. Further explanation of the diagnostic procedures is detailed elsewhere (submitted article). Clinical data were obtained from the family and the medical records.

All patients began a hypoproteic diet upon initial diagnosis by thin layer chromatography. None of the patients had used arginine-free essential amino acid specialized formula or oral sodium benzoate until their diagnosis was confirmed by demonstration of enzyme deficiency.

Neurodevelopmental, clinical and neurological features

The neurodevelopmental variables that we evaluated were age at gait acquisition, age at attainment of sphincter control, expressive verbal language ability and reading ability. Data on several clinical and neurological features were obtained: (1) age at presentation of initial neurological signs; (2) age at onset of lower limb spasticity; (3) loss of ability to ambulate; (4) loss of bladder control and urinary signs; (5) decrease in expressive vocabulary; (6) other neurological signs; (7) presence of recurrent vomiting; and (8) development of spontaneous self-selected low protein diet. The age at first clinical seizure and the associated electroencephalographic findings were also retrieved. We also reviewed information about other clinical abnormalities, especially the occurrence of acute episodes of hyperammonemia crisis leading to hospitalization and use of antiepileptic drugs.

Physical Measurements

Measures of height and head circumference were compared to standard normal curves [12]. Microcephaly was defined as head circumference below the third percentile, and growth deficit was defined as height below third percentile according to growth charts of CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

Biochemical exams

Various laboratory tests were performed during the ambulatory follow-up. Abnormal blood tests results related to the underlying disease were recorded: ammonia, transaminases (aspartate transaminase [AST] and alanine transaminase [ALT]), gamma glutamyl transferase, alkaline phosphatase and prothrombin time test.

RESULTS

The patients (12 male and 4 female) were the only cases of hyperargininemia in their families with the exception of 1 pair of brothers and 1 pair of monozygotic male twins. There was consanguinity in 6 of 14 unrelated families. The age of the patients at the time of the last

consultation (2011) ranged from 7 to 37 years (mean age, 20.2 ± 8.6 years S.D.). The physical measurements are described in Table 1. Growth deficit was observed in 13 patients. Microcephaly was confirmed in 6 patients.

All patients had normal neurodevelopment in the first year of life with the exception of 1 patient who manifested seizures at 3 months of age. Three patients developed signs before independent gait acquisition: one began tip-toe gait at 14 months of age and the other 2 patients achieved spastic gait at 17 months and 30 months of age. Lower limb spasticity was the first neurologic manifestation in 12 patients. Three individuals had seizure as the first sign, and 1 presented with ataxic tremor of the upper limbs. Except for 3 patients, all developed lower limb spasticity until the age of 5 years. All patients had worsening of spastic paraplegia. This led to joint restriction and they were not able to ambulate, except for one patient who is still able to walk independently. The progression of spasticity was variable in the group. Seven patients also developed spasticity of the upper limbs, which was classified as mild, moderate or severe. The main neurological features are summarized in Table 2.

All 16 patients presented with some degree of cognitive impairment. The patients were clinically classified by their adaptive functioning. Five patients had severe mental retardation (only able to eat independently); 7 patients had moderate mental retardation (able to use verbal language) and 4 patients had mild mental retardation (able to read). Language deficit of varying severity was observed in all of the patients. Three of 5 patients with severe mental retardation have never developed spoken language, despite their development of receptive language. The rest of the group was classified as able to speak only sentences or to report facts (narrative). Two patients lost the ability to elaborate spoken language, reflecting severe neurologic deterioration, and they were included in severe mental retardation subgroup. A decrease in expressive vocabulary was perceived in 5 patients among the individuals who maintained the ability to speak.

The youngest patient and the twins did not achieve sphincter control. Urinary incontinence emerged over the course of the disease as a neurological complication in 2 patients. After a period of disease progression, 2 additional patients of the group developed urinary urgency.

Four patients manifested other neurologic abnormalities. Subtle choreic movements of the hands and tongue were noted in patient 2 beginning at age 12. Patient 12 presented with behavioral problems and hyperactivity during childhood and began to develop clear signs of ataxia with tremor and dysmetria at age 6. Patient 13 presented with ataxia at age 5, showing dysmetria and dysdiadokokinesia. Patient 15 experienced mild involuntary tremor of the upper limbs at 29 years of age.

All but the youngest patient in this series had history of clinical seizures. Two patients had seizures only after 10 years of age. Except for 1 case considered normal (patient 16), the electroencephalography (EEG) showed abnormalities of background activity and/or epileptic findings (Fig 1). Even the youngest patient had epileptic findings on EEG without use of anticonvulsant drug. The EEGs showed epileptic activity, which was usually generalized. We noted focal findings in only 1 case (patient 12). These findings were described in Table 3. Two patients interrupted the use of phenobarbital (patients 7 and 8) after a period of 5 years without clinical seizures noticed by the parents. All the other patients were using antiepileptic drugs (phenytoin, phenobarbital, carbamazepine and/or valproate).

All but one patient had a clear history of spontaneous protein restriction with avoidance of high-protein foods. In some patients, this sign was noticed by the families only after the patient was at least 5 years of age. Furthermore, this avoidance was not always associated with nausea or vomiting. One teenage girl (patient 8) eventually had nausea and poor appetite around the time of menstruation. Except for 2 patients with history of strabismus, no other

visual problems were observed in this series of patients. None of the patients had hearing impairment.

Laboratory tests were performed at different sampling dates and are listed in Table 4. Most of the patients had at least one mildly elevated ammonia level test. These levels were not significantly increased in our patients who did not experience acute encephalopathy or episodes of hyperammonemia resulting in hospitalization. Most of patients had at least one low urea level test. Intermittent, slight increases in transaminases were observed in a few cases, but we did not observe any signs of liver involvement in these patients. Likewise, although 11 patients had decrease of prothrombin activity with normal activated partial thromboplastin time, we did not observe any symptomatic coagulation disorder.

DISCUSSION

Our study describes the clinical and neurological features of a large series of Brazilian patients with a rare metabolic disease. Only one Brazilian patient with hyperargininemia has been reported in the literature [13]. There are few published series of patients with hyperargininemia, and usually these series are comprised of cases from multiple centers or reviews of previously reported cases [1, 4].

Our series emphasizes that spastic paraplegia is the most relevant clinical manifestation of hyperargininemia. Spasticity caused joint restriction and led to loss of ambulation in almost all patients. However, the spasticity varied in age of onset and progression in our series, as previously suggested in literature [1-4]. We also observed mild ataxia and involuntary movements as less frequent neurological manifestations of hyperargininemia (4/16, 25%), with potentially smaller impacts on functional activities.

We detailed the electroencephalographic abnormalities in 16 patients. The epileptic findings of hyperargininemia in the literature are usually described in the content of case

reports [1, 14, 15]. Although our patients did not undergo serial EEGs over the course of their diseases, our study suggests that epilepsy is a frequent complication of hyperargininemia. EEGs showed generalized epileptic activity in almost all patients. Only one patient had epileptic focal findings. Only one patient had a normal EEG. In our series, clinical seizures were not related to hyperammonemia and were more frequent (15/16, 93%) than in previous studies (16/26, 62% and 33/55, 60%) [1, 4].

The EEGs of patients with severe mental retardation revealed frequent generalized spike and wave discharges and slowing of the background activity. An electroclinical correlation seems to exist between advanced encephalopathy observed in this subgroup of patients and the slowing of the background activity.

Microcephaly was present in 6 of 16 patients (37%), almost the same percentage as in a previous study (40%) [1]. The subgroup of patients with mild mental retardation did not have microcephaly. Some patients with small head circumference were taking antiepileptic drugs while their brains were still growing, and this may have contributed to the development of microcephaly [16].

Growth restriction was a consistent clinical abnormality in this series of patients (13/16, 81%), with the same frequency as in a previous study [1]. Treatment with low protein intake was not prescribed early in our patients. Growth deficit was observed in 13 individuals, and only one of them did not manifest protein self-restriction. This suggests a potentially significant role of spontaneous self-selected low protein diet on growth. However, we cannot rule out that growth restriction might be a complication of the underlying disease, as suggested by other authors [3, 5].

Hyperargininemia can be confused with other conditions, and therefore the correct diagnosis may be delayed. In our series, some patients were initially diagnosed with cerebral palsy or autosomal recessive hereditary spastic paraplegia [1, 9, 11, 17, 18]. Our study

highlights four features that could help to distinguish hyperargininemia from cerebral palsy: (1) the progression of spasticity, (2) the deterioration of the cognitive and language function, (3) the avoidance of high-protein foods and (4) the absence of a clear history of risk factors for hypoxia at birth or in the neonatal period. It is more difficult to distinguish hyperargininemia from hereditary spastic paraplegia, and laboratory tests may be necessary. However, some features provide clues to diagnosis of hyperargininemia: (1) the avoidance of high-protein foods; (2) the pronounced worsening of spasticity and (3) the infrequent hypertonic urinary bladder disturbance. The urinary urgency occurred late in the course of hyperargininemia in only two patients of our series. Differently, the lower limb spasticity is often accompanied by urinary urgency in hereditary spastic paraplegia.

As reported in the literature, we noted that hyperammonemia was absent in most patients, and even when there was hyperammonemia, the blood ammonia levels were not high enough to provoke acute encephalopathy [2-4]. The presence of mild hyperammonemia could raise suspicion for hyperargininemia in the context of spastic diplegia presentation. Similarly, low levels of urea can increase the clinical suspicion for hyperargininemia in patients with spastic paraparesis [3]. The slight increase in transaminases values and also decrease of prothrombin activity observed in some patients could indicate mild hepatic dysfunction related to hyperargininemia, as has been suggested by some authors [2, 3]. We did not observe signs of liver dysfunction, and these laboratory abnormalities could be attributed to the hepatotoxic effects of antiepileptic drugs in part of the group [19].

In reviewing our cases and those from the literature, we confirmed the difficulty of identifying the most relevant factors to the progression of neurological manifestations of hyperargininemia. We consider that the rate of neurologic deterioration is not related to the age at onset of signs. In our series, the only patient who developed neurological manifestations before 6 months of age (seizures) was also the only one who maintained the

ability to ambulate. However, we noted that our patients of the mild mental subgroup developed the spasticity of lower limbs at older ages compared to the other patients.

Some patients had clear and rapid neurological regression while others showed a more gradual worsening of lower limb spasticity. Other environmental factors may interfere with rate of progression of disease: (1) the amount of protein intake during infancy, (2) the age of onset of dietary treatment and (3) the success in controlling epilepsy. Protein intake is strongly influenced by the intensity of spontaneous protein restriction developed by the patient and by the age of onset of this sign. However, we noted that siblings with the same *ARG1* mutations, who were subjected to the same dietary pattern during childhood, evolved with different neurological impairments. Other factors can influence the severity of disease, including upregulation of the mitochondrial second isoenzyme arginase in other tissues (arginase II) and an individual susceptibility to brain damage caused by some metabolites of arginine, such as nitric oxide and guanidine compounds [2, 10, 20, 21].

Our retrospective study has several limitations. There was a bias in the patient population studied because arginine is not used as a target metabolite on newborn screening in Brazil and individuals affected by spastic paraparesis are commonly referred to our hospitals for rehabilitation. Regarding these aspects, individuals with clinical presentation of hyperargininemia in the severe neonatal form or without spasticity would most likely not be evaluated in our service. Furthermore, several clinical variables were obtained from the medical records. The parents provided much of this data from memory. Besides, some patients underwent the initial evaluation during adolescence, which may have affected the accuracy of the reported data. It was not possible to perform a psychometric cognitive assessment of patients. Therefore, we made a clinical classification based on functional skills. Some of these variables were subjective (such as vocabulary), as it was impossible to perform a quantitative assessment. Moreover, the physical measurements were not obtained

sequentially, making it difficult to ascertain the age of onset of growth failure and decline of head circumference.

At the time of the initial clinical diagnosis by thin layer chromatography, a hypoproteic diet with restriction of arginine intake was prescribed. It should be noted that most patients already had a low protein intake because of spontaneous avoidance of high-protein foods. However, adherence to this diet was difficult because of the feeding habits that had been established prior to the diagnosis as well as the socioeconomic limitations of our families.

In conclusion, we have reported the clinical spectrum and the natural history of hyperargininemia in a series of patients. The clinical features that distinguish hyperargininemia from cerebral palsy and hereditary spastic paraplegia are emphasized in this study. The occurrence of seizures in hyperargininemia may be more frequent than has been reported in previous studies. Progressive spastic diplegia is the key neurologic sign observed in this group, but variability in age of onset and progression was remarkable. Further reports of patients with hyperargininemia will be important to the understanding of the clinical variability of this rare condition.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their gratitude to the patients and their families for their constant collaboration during this research. We also acknowledge Guilherme Brand and Reinaldo Takata for laboratory support regarding quantitative amino acid analysis, enzymatic assays and mutation screening.

REFERENCES

- [1] Prasad AN, Breen JC, Ampola MG, Rosman NP. Argininemia: a treatable genetic cause of progressive spastic diplegia simulating cerebral palsy: case reports and literature review. *J Child Neurol* 1997;12:301-9.

- [2] Crombez EA, Cederbaum SD. Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. *Mol Genet Metab* 2005;84:243-51.
- [3] Scaglia F, Lee B. Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006;142C:113-20.
- [4] De Deyn PP, Marescau B, Qureshi IE, Cederbaum SD, Lambert M, Cerone R, Chamoles N, Specola N, Leonard JV, Gatti R, Kang SS, Mizutani N, Rezvani I, Snyderman SE, Terheggen HG, Yoshino M, Appel B, Martin JJ, Beaudet AL, Vilarinho L, Hirsch E, Jakobs K, van der Knaap MS, Naito H, Pickut BA, Shapira SK, Fuchshuber A, Roth B, Hylan K. Hyperargininemia: a treatable inborn error of metabolism? In: De Deyn PP, Marescau B, Qureshi IA, Mori A, editors. *Guanidino Compounds in Biology and Medicine*. London: John Libbey & Company Ltd.; 1997. p. 53-69.
- [5] Cederbaum S, Crombez EA. Arginase Deficiency. *GeneReviews*. University of Washington, Seattle. Last updated: October 5, 2010. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301338>.
- [6] Cowley DM, Bowling FG, McGill JJ, van Dongen J, Morris D. Adult-onset arginase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1998;21:677-8.
- [7] Picker JD, Puga AC, Levy HL, Marsden D, Shih VE, Degirolami U, Ligon KL, Cederbaum SD, Kern RM, Cox GF. Arginase deficiency with lethal neonatal expression: evidence for the glutamine hypothesis of cerebral edema. *J Pediatr* 2003;142:349-52.
- [8] Jain-Ghai S, Nagamani SC, Blaser S, Siriwardena K, Feigenbaum A. Arginase I deficiency: Severe infantile presentation with hyperammonemia: More common than reported? *Mol Genet Metab* 2011; 104:107-11.
- [9] Lee BH, Jin HY, Kim GH, Choi JH, Yoo HW. Argininemia presenting with progressive spastic diplegia. *Pediatr Neurol* 2011;44:218-20.

- [10] Deignan JL, De Deyn PP, Cederbaum SD, Fuchshuber A, Roth B, Gsell W, Marescau B. Guanidino compound levels in blood, cerebrospinal fluid, and post-mortem brain material of patients with argininemia. *Mol Genet Metab* 2010;100 Suppl 1:S31-6.
- [11] Scheuerle AE, McVie R, Beaudet AL, Shapira SK. Arginase deficiency presenting as cerebral palsy. *Pediatrics* 1993;91:995-6.
- [12] Hall JG. *Handbook of physical measurements*. 2nd ed. Oxford; New York: Oxford University Press; 2007.
- [13] Simoni RE, de Oliveira CP, Braga MJ, de Menezes CR, Llerena Junior JC, Correia PS, Rosa AA, Horovitz DG, Chaves CR, de Oliveira ML. Hyperargininaemia: a late-diagnosed Brazilian case with increased urinary excretion of homocystine. *J Inherit Metab Dis* 1997;20:715-6.
- [14] Bernar J, Hanson RA, Kern R, Phoenix B, Shaw KN, Cederbaum SD. Arginase deficiency in a 12-year-old boy with mild impairment of intellectual function. *J Pediatr* 1986;108:432-5.
- [15] Patel JS, van't Hoff WV, Leonard JV. Arginase deficiency presenting with convulsions. *J Inherit Metab Dis* 1994;17:254.
- [16] Kaindl AM, Asimiadou S, Manthey D, Hagen MV, Turski L, Ikonomidou C. Antiepileptic drugs and the developing brain. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:399-413.
- [17] Fink JK. Advances in the hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol* 2003;184 Suppl 1:S106-10.
- [18] Blair MA, Riddle ME, Wells JF, Breviu BA, Hedera P. Infantile onset of hereditary spastic paraplegia poorly predicts the genotype. *Pediatr Neurol* 2007;36:382-6.
- [19] Bjornsson E. Hepatotoxicity associated with antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand* 2008;118:281-90.

[20] Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, Kern RM, Yoo P, Iyer RK. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 2004;81 Suppl 1:S38-44.

[21] Deignan JL, Marescau B, Livesay JC, Iyer RK, De Deyn PP, Cederbaum SD, Grody WW. Increased plasma and tissue guanidino compounds in a mouse model of hyperargininemia. *Mol Genet Metab* 2008;93:172-8.

Figure 1. Awake state electroencephalogram (EEG) recordings. A and B: Generalized slow spike-wave complexes discharges and slowing of the background activity observed in twins with severe mental retardation (patients 3 and 4). C: Generalized spike and wave discharges in a patient with moderate mental retardation (patient 10). D: For comparison, normal background activity in a patient with mild mental retardation (patient 16).

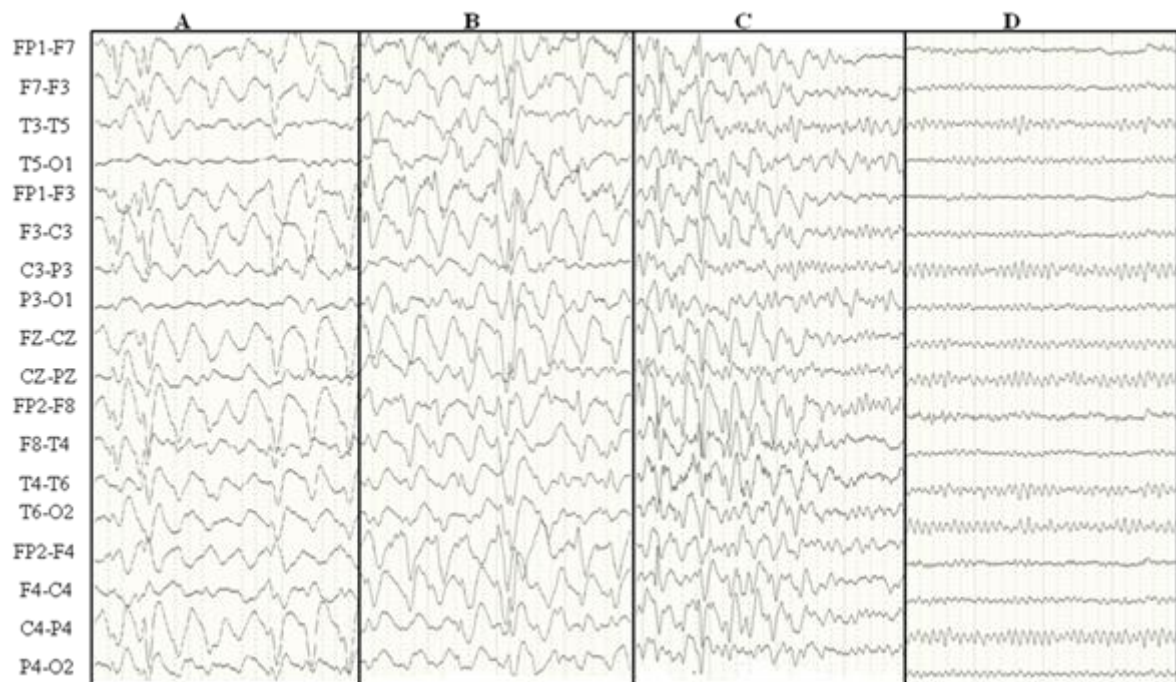


Table 1. Arginine blood levels, erythrocyte arginase activity, physical measurements and characteristics of 16 patients with hyperargininemia.

Patient	Gender, age (yr)	Consanguinity	Arginase activity [U/L] (% of control mean)	Blood arginine concentration (μ M)	Mental retardation classification	Microcephaly/OFC	Growth deficit/Height	Avoidance of protein-rich foods (yr)	Vomiting
1	M, 21	No	0.9 (9.4)	753	severe	P75	+	+, 4-5	+
2	F, 13	Yes (2nd cousins)	0.0 (0.0)	509	severe	+	+	+, NA	+
3	M, 12	No	0.9 (9.4)	397	severe	P3-10	+	+, 1	-
4	M, 12	No	1.0 (10.1)	547	severe	+	+	+, 1-2	+
5	M, 24	Yes (2nd cousins)	0.0 (0.0)	506	severe	P3-10	+	+, 1	-
6	M, 25	Yes (2nd cousins)	1.0 (10.1)	573	moderate	+	+	+, 1-2	-
7	F, 24	Yes (2nd cousins)	0.5 (5.2)	572	moderate	+	+	+, 3	+
8	F, 16	Yes (1st cousins)	0.5 (5.2)	420	moderate	+	+	+, 2	+
9	M, 17	No	0.8 (8.3)	355	moderate	+	+	+, 7	-
10	M, 7	No	0.9 (9.4)	685	moderate	P3	+	+, 6	+
11	M, 11	No	2.0 (20.8)	314	moderate	P25-50	+	+, 3	+
12	M, 15	No	1.1 (11.5)	431	moderate	P97	P10-25	+, 4	+
13	M, 28	No	0.6 (6.3)	567	mild	P75	+	-	-
14	M, 31	No	0.2 (2.1)	388	mild	P25	P25-50	+, 8	+
15	M, 31	Yes (1st cousins)	1.3 (13.5)	343	mild	P97	P25-50	+, NA	+
16	F, 37	Yes (1st cousins)	0.4 (4.2)	423	mild	P3	+	+, 9	-
Controls [mean \pm SD]			9.6 \pm 2.8 (n=46)	106 \pm 18 (n=15)					
Sib pairs: patients 3 & 4 (monozygotic twins), 5 & 6.									
Abbreviations:									
M = male; F = female; yr = years; P = percentile; NA = not available									

Table 2. Neurodevelopmental features, neurological presentation and progression of disease in 16 patients with hyperargininemia.

Patient	Age at diagnosis (yr)	Age of gait acquisition (mo)	First neurological sign	LLS onset / Age of gait loss (yr)	Spasticity of upper limbs	Other neurological features	Spoken language	Worsening of language function	Sphincter control (yr)	Urinary incontinence (I) or urgency (U)	Cognitive skills / Mental retardation
1	10	12	36 mo, LLS	5	severe	-	sentence	loss of spoken language, 7 yr	2	I, 5 yr	F/ severe
2	12	17, abnormal	17 mo, LLS	4	severe	choreic movements	sentence	loss of spoken language, 10 yr	2-3	I, 12 yr	F/ severe
3	7	11	21 mo, LLS	3	moderate	-	No	-	No	-	F/ severe
4	7	11	22 mo, LLS	3	mild	-	No	-	No	-	F/ severe
5	12	13	15 mo, LLS	5	mild	-	No	-	< 2	-	F/ severe
6	14	13	16 mo, LLS	6	No	-	sentence	decrease of vocabulary	< 2	-	S,F/ moderate
7	15	12	33 mo, seizure	4 / 13	mild	-	sentence	No	2-3	-	S,F/ moderate
8	6	30, abnormal	3 mo, seizure	2.5 / No	No	-	sentence	No	2-3	-	S,F/ moderate
9	14	17	4 yr, LLS	9	No	-	sentence	decrease of vocabulary	2-3	-	S,F/ moderate
10	5	16	36 mo, LLS	6	No	-	sentence	decrease of vocabulary	No	-	S,F/ moderate
11	6	16	18 mo, LLS	7	No	-	sentence	No	2-3	-	S,F/ moderate
12	6	14, abnormal	14 mo, LLS	13	No	hyperactivity, ataxia	sentence	No	2-3	U, 10 yr	S,F/ moderate
13	18	12	24 mo, upper limb tremor	10 / 14	No	ataxia	narrative	decrease of vocabulary	< 2	U, 22 yr	R,S,F/ mild
14	21	8	4 yr, seizure	5 / 16	mild	-	narrative	decrease of vocabulary	2-3	-	R,S,F/ mild
15	21	12	10 yr, LLS	13	No	involuntary tremor of upper limbs	narrative	No	2-3	-	R,S,F/ mild
16	27	28	7 yr, LLS	27	No	-	narrative	No	2-3 y	-	R,S,F/ mild

Abbreviations:
 yr = years; mo = months;; LLS = lower limb spasticity;
 F = able to feed; S = able to speak; R = able to read

Table 3. Presence of seizures and electroencephalogram (EEG) findings in patients with hyperargininemia.

Patient	Mental retardation classification	Age at onset of seizures (years)	Age of time of EEG (years)	EEG abnormal findings
1	Severe	5	14	slowing of background activity; generalized slow spike-wave complex discharges (2-3 Hz)
2	Severe	4	12	slowing and diffuse disorganization of background activity; generalized and multifocal paroxysms of repetitive spike and sharp waves
3	Severe	4	12	slowing and severe diffuse disorganization of background activity; generalized high amplitude slow wave discharges (< 2.5 Hz)
4	Severe	7	12	slowing and severe diffuse disorganization of background activity; generalized high amplitude slow wave discharges (< 2.5Hz)
5	Severe	3	23	slowing of background activity; frequent and generalized discharges of spikes, sharp waves and slow spike wave complexes
6	Moderate	2	24	slow and irregular background activity; generalized discharges of spikes and sharp waves
7	Moderate	3	24	irregular diffuse and bilateral slow waves (5-7.5 Hz); generalized discharges (3-4 Hz) of spike-wave complexes
8	Moderate	0.25	15	irregular slow waves (5-7.5 Hz) mixed to background activity; anterior discharges of spike-wave complexes
9	Moderate	6	17	irregular diffuse and bilateral slow waves (5-7.5 Hz); generalized spike and sharp waves discharges; diffuse, bilateral and synchronous discharges of spike-wave complexes (2.5-3.5 Hz)
10	Moderate	No	5	frequent multifocal paroxysms of spike and sharp waves
11	Moderate	9	9	slowing of background activity; irregular diffuse and bilateral slow waves (5-7.5 Hz); generalized high voltage slow-wave complex discharges
12	Moderate	2	6	diffuse disorganization of background activity; focal spikes in the parietal region bilaterally
13	Mild	10	14	disorganization of background activity; generalized sharp wave discharges
14	Mild	4	29	diffuse disorganization of background activity; irregular, diffuse and bilateral slow waves (5-7.5 Hz); numerous discharges of diffuse, bilateral high voltage spike-wave complexes
15	Mild	30	30	slowing and diffuse disorganization of background activity
16	Mild	22	33 and 37	normal

Table 4. Laboratory tests performed in 16 ambulatory patients with hyperargininemia at different dates.

Patient	ammonia ($\mu\text{mol/L}$)	urea (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	GGT (U/L)	ALP (U/L)	PA (% of controls)
1	56; 27	30	42; 35	79; 25; 49	68	172	79
2	123; 60; 46	13; 19; 20; 27	25; 24	39; 33	34	205	59
3	60; 35; 32	15	55	72	19	223	72
4	52; 35; 27	14	52	67	17	201	78
5	53; 45; 29; 13	8	19	48	8	114	66
6	44; 30; 26	12; 22	16	21	9	83	65
7	57; 36; 27; 13	15	23; 33	39; 49	10	129	70
8	69; 55; 51; 44; 42	7	70; 47; 77	104; 37; 104	18	NA	74; 70
9	49; 12; 8	9	40; 42	44; 39	53	384	83
10	104; 41	21	72	156	15	310	50
11	60; 24	29	38	15	25	109	78; 75
12	50; 49; 33; 31; 10	4; 17	28	40	14; 13	211	63; 51
13	116; 59; 52	9; 15	49; 69; 28; 31	86; 125; 49	178; 188	111; 393	48
14	47; 34; 32; 25; 19	10; 16	26; 28	41; 43	12; 15	204; 213	60; 62
15	20	13; 14; 17; 21	60; 28; 29; 32	154; 58; 69; 87	34	75	70
16	30	8; 9; 10; 11; 12	16	14	30; 19	113; 185	95
mean \pm SD	42.6 \pm 23.9	14.9 \pm 6.4	39.1 \pm 17.4	61.5 \pm 37.5	38.9 \pm 51.5	190.8 \pm 93.6	68.4 \pm 11.7
Reference range	< 40	15-30	8-40	8-56	8-78	43-128	75-100

Abbreviations:

AST = aspartate transaminase

ALT = alanine transaminase

GGT = gamma glutamyl transferase

ALP = alkaline phosphatase

PA = prothrombin activity

NA = not available

ARTIGO 2

Analysis of novel *ARG1* mutations causing hyperargininemia and correlation with arginase I activity in erythrocytes.

Analysis of novel *ARG1* mutations causing hyperargininemia and correlation with arginase I activity in erythrocytes.

Authors:

Daniel Rocha Carvalho ^{a,b} (danielcarvalho@sarah.br)

Guilherme Dotto Brand ^a (13248@sarah.br)

Jaime Moritz Brum ^a (jaime@sarah.br)

Reinaldo Issao Takata ^a (reinaldo@sarah.br)

Carlos Eduardo Speck-Martins ^a (speck@sarah.br)

Riccardo Pratesi ^b (pratesir@unb.br)

a- Genetic Unit, SARA Rehabilitation Hospital, SMHS Quadra 501 Conj. A, Brasilia, Distrito Federal, Brazil, 70335-901.

b- School of Medicine, Brasilia University, Sala BC-212, Campus Universitario, Brasilia, Distrito Federal, Brazil, 70910-900.

Corresponding author: Dr. Daniel R. Carvalho, Genetic Unit, SARA Rehabilitation Hospital, SMHS Quadra 501 Conj. A, Brasilia-DF, 70335-901, Brazil. Tel.: +55-61-3319-1111; fax: +55-61-3319-1538; e-mail: danielcarvalho@sarah.br

Abstract

Hyperargininemia (HA) is an autosomal recessive disease that typically has a clinical presentation that is distinct from other urea cycle disorders. It is caused by the deficient activity of the enzyme arginase I, encoded by the gene *ARG1*. We screened for *ARG1* mutations and measured erythrocyte enzyme activity in a series of 16 Brazilian HA patients. Novel mutations, in addition to previously described missense mutations, were analysed for their effect on the structure, stability and/or function of arginase I (ARG1) using bioinformatics tools. Three previously reported mutations were found (p.R21X; p.I11T and p.W122X), and five novel mutations were identified (p.G27D; p.G74V; p.T134I; p.R308Q; p.I174fs179). The p.T134I mutation was the most frequent in the Brazilian population. Patients carrying the p.R308Q mutation had higher residual ARG1 decreased activity, but presented no distinguishable phenotype compared to the other patients. Bioinformatics

analyses revealed that missense mutations (1) affect the ARG1 active site, (2) interfere with the stability of the ARG1 folded conformation or (3) alter the quaternary structure of the ARG1. Our study reinforced the role of Arg308 residue for assembly of the ARG1 homotrimer. The panel of heterogeneous *ARG1* mutations that cause HA was expanded, nevertheless a clear genotype-phenotype correlation was not observed in our series.

Keywords

Urea cycle disorder; Arginase deficiency; Arginine; Mutational screening; Missense mutation; Computational analysis.

1. Introduction

Hyperargininemia (HA) is a rare autosomal recessive metabolic disorder (OMIM ID: 207800) that is caused by a deficiency in the enzyme arginase I [ARG1 (EC 3.5.3.1)], which is expressed mainly in the cytosol of hepatocytes. ARG1 is the final enzyme in the urea cycle and catalyses the conversion of arginine to urea plus ornithine. The main biochemical abnormality of HA is the increased arginine level in blood and other fluids. The disease is pan-ethnic with an estimated incidence of 1 in 2 million live births (Scaglia and Lee, 2006). The clinical presentation of HA is quite distinct from those of other urea cycle disorders, and the occurrence of hyperammonemic encephalopathy episodes is uncommon. HA usually has an insidious onset and manifests a progressive neurological syndrome consisting of spastic paraplegia, cognitive deficit and epilepsy in childhood. However, acute neonatal clinical presentation and late adult-onset disease have also been described (Prasad et al., 1997; Cowley et al., 1998; Crombez and Cederbaum, 2005).

The hepatic and red cell isoforms of ARG1 are identical. ARG1 activity in erythrocytes is closely correlated with ARG1 activity in liver cells (Brusilow and Horwich, 2001; Crombez and Cederbaum, 2005). ARG1 is a metalloproteinase with a binuclear manganese centre that contains an α/β fold with central parallel β -sheet flanked by α -helices (Dowling et al., 2008). The mechanism of action of the enzyme is well known (Ash et al., 1998; Shishova et al., 2009). At physiological pH, ARG1 is found as a homotrimer, in which most of the intersubunit interactions are mediated by the C-terminal S-shaped tail (Lavulo et al., 2001; Garcia et al., 2009). Correct assembly of the trimer is essential for normal enzymatic activity, and the Arg308 residue in particular is critical for oligomerisation (Lavulo et al., 2001; Garcia et al., 2009).

The arginase I enzyme is encoded by the gene *ARG1*, the only gene associated with HA and located on chromosome 6q23. A second gene (*ARG2*) encodes arginase II, a mitochondrial enzyme expressed in other tissues, whose function is not well-defined (Crombez and Cederbaum, 2005; Scaglia and Lee, 2006).

A number of heterogeneous *ARG1* mutations identified in different populations have been implicated in the HA phenotype (Grody et al., 1992; Uchino et al., 1992; Vockley et al., 1994; Uchino et al., 1995; Edwards et al., 2009; Jain-Ghai et al., 2011; Lee et al., 2011). Nonsense mutations and deletions have been demonstrated to occur randomly along the gene. Missense mutations occurring in highly conserved regions of the gene are the most frequent. The variation in the clinical severity of HA cannot be explained by the differences in the

nature of *ARG1* mutations, and a clear genotype-phenotype correlation has not yet been described for this disease (Vockley et al., 1996; Crombez and Cederbaum, 2005; Scaglia and Lee, 2006).

In silico analyses can provide useful information on the pathogenicity of mutations and the mechanisms by which they impair enzyme function. Bioinformatics tools have been developed to evaluate the potential effects of mutations on protein structure and stability (Thusberg and Vihinen, 2009). Protein stability predictors, such as the FoldX algorithm, provide a quantitative estimation of the stabilising/destabilising effects of mutations by means of an energy function calibrated to fit experimental values (Guerois et al., 2002). In some cases, it is even possible to correlate residual enzymatic activity to the extent of destabilisation introduced by mutations (Pey et al., 2007).

We screened for *ARG1* mutations and studied residual arginase I activity in 16 Brazilian HA patients. The destabilising effects of novel and previously described missense mutations were grouped according to their effect on the structure and function of ARG1.

2. Material and methods

2.1 Patients

The patients from four different geographic regions of Brazil (12 male and four female) were diagnosed during neurological evaluation of progressive spastic paraparesis in a rehabilitation network of public hospitals. They were screened initially by thin layer chromatography of plasma amino acids and diagnosed after arginine serum quantification analysis and determination of arginase I activity in red blood cells. The research was reviewed and approved by the Ethics Committee of our hospitals. Informed consent was obtained from the legal guardians of all patients. Clinical data were obtained by retrospective evaluation of medical records and family information. All HA patients are alive and constitute the single case within his/her family, except for one pair of male sibs and one pair of monozygotic twin brothers.

2.2 Arginine concentration

Serum amino acid analysis was performed by mass spectrometry using the aTRAQ amino acid kit (AB Sciex, Foster City, CA, USA) on an API 3200TM LC/MS system (AB Sciex, Foster City, CA, USA).

2.3 Arginase activity

Quantitative colorimetric activity determination was performed in erythrocytes from 16 patients and 46 age- and gender-matched controls using the QuantiChromTM Arginase Assay Kit (DARG-200) (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA). Caution was taken to avoid haemolysis.

2.4 Mutation screening

Genomic DNA was extracted using a salting out procedure. Due to the Portuguese ancestry of the Brazilian population, all patients were initially screened for the p.R21X mutation by N1aIII fragment restriction analysis (Cardoso et al., 1999). The eight protein-coding exons and flanking intronic sequences of the *ARG1* gene were directly sequenced after PCR amplification. The primer sequences and PCR conditions are described in the supplementary material (Table S1). Bidirectional sequencing reactions by the Sanger method were prepared with the Big Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's protocol and the reactions run on a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequencing data were compared to consensus sequence (GenBank ID: NG_007086.2) using SeqScape Software v2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analysed against the variants listed in the single nucleotide polymorphism (SNP) database (dbSNP, NCBI).

2.5 Statistical analysis

The non-parametric Mann-Whitney U test was applied to comparisons of red blood cell arginase activity between groups of different genotypes.

2.6 Bioinformatics analyses of missense mutations in HA patients

Multiple sequence alignment of the human (P05089), bovine (Q2KJ64), mouse (Q61176), African clawed frog (P30759) and the common carp (Q4A3J2) arginase I was performed using CLUSTALW2. The pathogenicity of ARG1 missense mutations was predicted using the web servers nsSNPAnalyzer, SNAP and SNPs3D (Bao et al., 2005; Yue et al., 2006; Bromberg and Rost, 2007). Stop codons and deletions into the *ARG1* were not considered. Analysis of the effects of *ARG1* mutations, including an examination of the structural disorder of the ARG1 protein, was performed using DISOPRED2 and GLOBPLOT 2.3 (Linding et al., 2003; Ward et al., 2004). Aggregation propensities were evaluated using TANGO and AGGRESCAN (Fernandez-Escamilla et al., 2004; Conchillo-Sole et al., 2007). ASAView was used to verify the solvent accessibility of amino acids (Ahmad et al., 2004). Structural analyses were performed based on the crystal structure of ARG1 at a resolution of 1.29 Å bound to the inhibitor 2(S)-amino-6-borono-hexanoic acid (PDB 2AEB). The FoldX plugin for YASARA was used to estimate the impact of mutations on protein stability (Guerois et al., 2002; Krieger et al., 2002; Van Durme et al., 2011). Amino acids known to participate in substrate catalysis were fixed previously to the FoldX RepairPDB command. FoldX calculates the free energy of folding of the wild-type (WT) and the mutated protein (MT) and estimates whether the mutation is destabilising ($\Delta\Delta G > 0$) or stabilising ($\Delta\Delta G < 0$) through the formula $\Delta\Delta G = \Delta G(\text{MT}) - \Delta G(\text{WT})$. The interaction energy of ARG1 monomers was calculated by FoldX using the rat liver arginase (PDB 1RLA) as model.

3. Results

3.1 Clinical features, arginine concentration and arginase I activity

The patients presented with the classic clinical features of HA during childhood with progressive worsening of spastic paraplegia, variable degree of cognitive impairment and history of clinical seizures or electroencephalographic epileptic findings. The clinical data were summarized in Table 1. From the group of 16 patients, five individuals were clinically classified as having severe mental retardation (only able to feed); seven patients as having moderate mental retardation (able to use verbal language) and four patients as having mild mental retardation (able to read). There was consanguinity in 6 of 14 families. All patients had decreased ARG1 activity in their erythrocytes (ranged from 0 to 20.8% of mean of controls). The blood arginine level prior to treatment ranged from 314 to 753 μM . This was

approximately at least 3 times higher than the mean arginine level of controls (106 μ M). These values are described in Table 1.

3.2 *ARG1* mutations

Two mutant alleles of *ARG1* gene were found in all 16 patients with HA. A total of eight distinct mutations were detected in the 14 families (Table 1). Only two of the five patients with the Portuguese mutation c.61C>T (p.R21X) were homozygous and three patients were compound heterozygous. We found two other previously reported mutations, c.32T>C (p.I11T) and c.365G>A (p.W122X). The remaining five mutations, none of which have been previously reported, are: (1) c.80G>A (p.G27D), (2) c.221G>T (p.G74V), (3) c.404C>T (p.T134I), (4) c.923G>A (p.R308Q) and (5) c.523delG. This single base deletion leads to a frameshift mutation and creates a premature stop codon (p.I174fs179). The novel p.T134I mutation was homozygous in all seven patients and it is the most frequent of our series.

The median residual activity of arginase I in erythrocytes from patients carrying the p.R308Q mutation was significantly higher (1.3 U/L) compared to the other patients (0.6 U/L) (Mann-Whitney, $p = 0.008$). However, the clinical presentation and the disease progression rate for the three p.R308Q mutation patients were not considerably different compared with patients with other mutations (Table 1). There was no significant difference in the comparison of arginase I activity values of patients with other genotypes.

3.3 Bioinformatics analyses

The impact of novel and all previously described missense mutations on the structure of human arginase I (ARG1) was investigated *in silico* (Grody et al., 1992; Uchino et al., 1992; Vockley et al., 1994; Uchino et al., 1995; Edwards et al., 2009; Jain-Ghai et al., 2011; Lee et al., 2011). The four novel missense mutations described here occur on highly conserved amino acids within the Chordate ARG1 protein (Fig. 1). While p.G27D and p.T134I were classified as pathogenic by SNAP, nsSNPAnalyzer and SNPs3D, the classification of p.G74V and p.R308Q was not consensual, requiring further parameters to be evaluated (Table 2). No significant changes were observed in the profiles for ordered/disordered regions for any of the considered *ARG1* mutations. Furthermore, none of the *ARG1* mutations altered significantly the aggregation profile of proteins. The free energy change ($\Delta\Delta G$) associated with each of

these mutations, as predicted by the FoldX algorithm, is displayed in Table 2. Mutations with a $\Delta\Delta G > 3$ kcal/mol are considered highly destabilising (Tokuriki et al., 2007). The novel mutations p.G74V and p.G27D were regarded as highly destabilising by FoldX, while p.T134I and p.R308Q were predicted to cause no significant impact on the enzyme stability. Novel and all known missense *ARG1* mutations were grouped according to their mechanism of enzyme function impairment, following the proposal of a previous study (Ash et al., 1998).

3.3.1 Mutations p.G74V and p.G27D reduce the folded ARG1 stability due to the introduction of steric clashes and buried hydrophilic groups

The mutation p.G74V leads to a 14.4 ± 0.7 kcal/mol free energy change ($\Delta\Delta G$) on the folded conformation of ARG1, mainly due to the introduction of steric clashes and conformational hindrances between amino acid side chains in the mutant enzyme relative to the wild-type (Fig. 2a,b). Gly74 is located on the αB segment of ARG1 with an alpha carbon that is only separated from the oxygen atom in the backbone of Gly161 by 3.2 Å. Thus, replacement of the glycine with a valine side chain in the p.G74V mutant leads to steric clashes with Gly161 and hindrances on the Lys75 and Phe162 conformations (Fig. 2b). The previously described pathogenic mutations p.G138V and p.G98S also introduce packing defects on the enzyme folded conformation by similar mechanisms. Hence, FoldX predicts free energy changes of similar magnitude, as listed on Table 2.

The novel mutation p.G27D destabilizes ARG1 ($\Delta\Delta G = 8.8 \pm 0.2$ kcal/mol) due to the introduction of steric clashes and buried hydrophilic group. The amino acid residue Gly27 is located on segment $\alpha A1$ facing segment $\beta 3$ in the protein's core. It has no solvent accessibility and is surrounded by hydrophobic amino acids, such as Leu31, Val278, Val24 and Val30 (Fig. 2c). Substitution of Gly27 with an aspartic acid results in destabilisation that arises mainly from clashes with Gly98 and a buried carboxyl group (Fig. 2d). The previously described mutations p.G235R, p.I111T and p.G305R introduce similar packing defects and they are known to implicate in enzyme deficiency in HA patients (Table 2).

The mutation p.A298P was recently described as pathogenic in series of HA cases (Jain-Ghai et al., 2011). It is also predicted to destabilize ARG1 significantly ($\Delta\Delta G = 3.6 \pm 0.1$ kcal/mol). The substitution of an alanine with a proline in the p.A298P mutant produces side-chain clashes with Asn294 and disrupts the network of backbone hydrogen bonds that stabilizes the α -helical H2 segment.

3.3.2 Mutation p.T134I introduces defects into the ARG1 active-site

According to FoldX, the mutation p.T134I does not result in a significant ARG1 destabilization ($\Delta\Delta G = 0.9 \pm 0.0$ kcal/mol). Nevertheless, it was considered pathogenic by the SNAP, nsSNPAnalyzer and SNPs3D algorithms. The previously described mutations p.D128G, p.H141L, p.G142E and p.D234H presented a similar pattern (Table 2). Indeed, mutations on active site residues impair enzyme function by the substitution of catalytically relevant chemical groups rather than protein destabilization (Pey et al., 2007).

Analysis of the ARG1 crystal structure reveals that Thr134 is part of the substrate binding cavity. Thr134 is located in loop 4, proximal to amino acids that bind to the substrate directly, as in the case of Asp183, Ser137 and Asn130, or via water-mediated hydrogen bonds, as in the case of Thr135 (Fig. 3). Thr134 participates in the hydrogen bonding network that positions both Asp183 and Asn130 to interact with the α -amino group of the substrate (Fig. 3). Additionally, the hydroxyl group of the Thr134 side-chain can form a hydrogen bond with the α -amino group of Asn130, further stabilising the loop that positions Asp183 and Asn130 in the active-site (Fig. 3). Substitution of a threonine with an isoleucine residue disrupts this hydrogen bonding network and may lead to rearrangements that cannot be adequately modelled by FoldX (Tokuriki et al., 2007).

3.3.3 Mutation p.R308Q affects the quaternary structure of the ARG1 enzyme

The deleterious effect of the novel mutation p.R308Q detected in three patients with HA could not be reliably predicted by the algorithms used in this study (Table 2). Furthermore, FoldX indicates that this specific mutation has a negligible impact on protein stability ($\Delta\Delta G = 0.4 \pm 0.1$ kcal/mol). In arginase from rat liver, Arg308 nucleates a series of intramonomer and intermonomer salt links that modify the monomer to trimer equilibrium (Lavulo et al., 2001). The energy of interactions between wild-type ARG1 monomers (ΔG_{int}) and between mutant ARG1 monomers was investigated using FoldX. The p.R308Q mutation lowers the interaction energy of monomers by 3.5 kcal/mol. It is due to the disruption of the salt bridges that are normally established by Arg308 of monomer A and Asp204 of monomer B, as depicted in Figure 4.

4. Discussion

Our mutation screening of 16 HA Brazilian patients, a population that had not yet been investigated, increases the number of *ARG1* mutations involved in arginase deficiency. All patients have the classical HA phenotype which consists of spastic diplegia associated with cognitive impairment and epilepsy during childhood. Only three previously reported mutations were found and five novel mutations were identified, specifically, one exonic single base deletion and four missense mutations. The novel p.T134I mutation was the most common in our series and was always found in homozygosity (7/16, 43%). It is possible to speculate that is due to a founder effect in our population. We were able to locate a single case report of one Brazilian patient with HA in the literature, and this study did not contain data at the gene level (Simoni et al., 1997).

A relationship between the p.R308Q mutation and the degree of residual enzyme activity was noted in our study. However, variability regarding the age of onset and the rate of progression of clinical features of HA was not influenced by residual *ARG1* activity, as has been suggested by previous studies (Vockley et al., 1994; De Deyn et al., 1997; Prasad et al., 1997; Crombez and Cederbaum, 2005; Scaglia and Lee, 2006). In addition to the age of onset and adherence to a protein-restricted diet, other factors that might influence the severity and rate of neurologic deterioration are: (1) development of spontaneous avoidance of high-protein foods during early infancy, (2) upregulation of the mitochondrial second isoenzyme arginase (arginase II) in other tissues and (3) susceptibility of the developing brain to neurotoxic damage caused by certain metabolites of arginine such as guanidine compounds and nitric oxide (Cederbaum et al., 2004; Crombez and Cederbaum, 2005; Deignan et al., 2010).

A recent paper suggested a possible genotype-phenotype correlation in *ARG1* deficiency (Jain-Ghai et al., 2011). The authors pointed out that neonatal presentation cases have severe nonsense, splice site or frameshift mutations, and that patients with the classic later onset have at least one missense mutation. However, this was observed neither in our two patients nor in the three Portuguese patients with a homozygous p.R21X nonsense mutation and clinical onset of signs during childhood (Cardoso et al., 1999). Additionally, patient 9 in our study had heterozygous nonsense mutations and also presented with the classical phenotype.

Much effort has been devoted to the development of bioinformatics tools able to evaluate the effects of sequence variation on proteins and thus provide some insight into the detailed mechanisms of genetic diseases (Thusberg and Vihinen, 2009; Khan and Vihinen,

2010). In the present study, we used a combination of algorithms that rely mostly on sequence conservation (SNAP, nsSNPAnalyzer and SNPs3D) and a protein stability predictor (FoldX) to study the mutations that give rise to HA. Apart from the p.T290S mutation, which was predicted to be neutral by these tools, all of the mutations analysed here were found to be pathogenic by at least one algorithm. This is consistent with the low ARG1 activity measured in erythrocytes of patients and reinforces that the novel mutations p.T134I, p.G27D, p.G74V and p.R308Q are the cause for enzyme deficiency that leads to hyperargininemia. The p.T290S conservative substitution does not represent a true pathologic mutation, as suggested by the authors of the original report identifying the mutation and by Ash et al. (Grody et al., 1992; Ash et al., 1998).

Missense mutations are more prevalent in our study as has been reported in other series of HA patients (Grody et al., 1992; Uchino et al., 1992; Vockley et al., 1994; Uchino et al., 1995). The groups of mutations presented here are an expansion of those introduced in 1998 (Ash et al., 1998). FoldX predicted large destabilising effects as a result of the p.I11T, p.G138V and p.G235R mutations, which have been previously implicated in ARG1 packing defects. The p.G235R mutation was also shown to compromise the manganese binding site (Ash et al., 1998). Novel mutations p.G74V and p.G27D, as well as p.G98S, p.G305R and p.A298P were predicted to introduce steric clashes and buried hydrophilic groups. The destabilising effect of the mutation p.A298P was most likely underestimated by FoldX, as this algorithm assumes a fixed protein backbone structure (Tokuriki et al., 2007). Proline is a known α -helix breaker, and the interruption of the H2 segment may lead to major structural rearrangements, especially at the S-shaped tail.

Active site residues have a high degree of sequence conservation; however, mutations in these critical residues do not necessarily result in significant protein destabilisation (Pey et al., 2007). It is not possible to estimate the specific molecular rearrangements induced by the p.T134I mutation on the ARG1 substrate binding cavity. Nevertheless, some experiments provide insight into the magnitude of these rearrangements. For instance, deletion of Asn130, which is spatially adjacent to Thr134, does not significantly disturb substrate catalysis by the rat liver arginase. However, substitution of Asn130 with bulky aromatic amino acids compromises substrate affinity and the chemistry of catalysis (Shishova et al., 2009). The introduction of a branched chain hydrophobic isoleucine at an adjacent position in mutant p.T134I may impart similar distortions in the active site geometry.

Site-directed mutagenesis experiments targeting the Arg308 residue of the rat liver arginase aid in the interpretation of the p.R308Q mutation. The substitution of this particular

amino acid compromised subunit interactions, leading to a shift in dissociation towards monomers by a factor of at least 10^5 (Lavulo et al., 2001). An *in vitro* study showed that the monomeric arginase variants R308A, R308E and R308K have a catalytic efficiency equivalent to 13%-17% of the trimeric wild-type enzyme (Lavulo et al., 2001). This finding could explain the higher values of residual arginase activity in erythrocytes that we observed in the subgroup of three patients carrying the mutation p.R308Q. It is probable that FoldX underestimates the effect of the p.R308Q mutation on the interaction energy of ARG1 monomers. FoldX calculates that the rupture of the salt bridge between Arg308 and Asp204 lowers the dimer affinity by 3.5 kcal/mol, which is equivalent to a $\sim 10^2$ shift in monomer dissociation. However, the software calculates the interaction energy of monomers based on the structure of the bound trimer and therefore considers that the remaining salt bridges at the interface are maintained in the mutant enzyme, whereas experimental data state that the ARG1 trimer is not even assembled in the absence of Arg308 (Lavulo et al., 2001).

Limitations of our work must be mentioned. It was not possible to perform functional and structural studies of the mutant ARG1 proteins. A second limitation is the absence of a formal psychometric cognitive evaluation of patients, leading to a clinical classification based on functional skills. In our retrospective study, there is a bias in the assessment of patient population. It is due to the fact that our country does not use arginine as a target metabolite in the neonatal screening program and individuals affected by spastic paraplegia are commonly referred for rehabilitation within our network of hospitals. Because of these factors, individuals with an atypical clinical presentation of HA (severe neonatal or mild neurological signs) would most likely not be evaluated in our service.

Our study reinforces the importance of combining various bioinformatics methods to analyse the molecular consequences of missense mutations, especially in single-gene, rare, autosomal recessive disorders such as HA (Thusberg and Vihinen, 2009). This had been done for other diseases such as deficiency of phenylalanine hydroxylase (phenylketonuria) and deficiency of cystathionine beta synthase (homocystinuria) (Pey et al., 2007; Wei et al., 2010).

5. Conclusions

Novel and previously described missense *ARG1* mutations were grouped according to the mechanism of deleterious effect on arginase I. Patients carrying the p.R308Q mutation had higher residual ARG1 decreased activity, but presented no distinguishable phenotype

compared to the other patients. The panel of heterogeneous *ARG1* mutations that cause HA was expanded and the p.T134I mutation was the most frequent in Brazilian population. A genotype-phenotype correlation was not observed in our patients.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Monica Navarro, Dr. Katia Coelho and Dr. Dalton Portugal for relevant help with clinical data. We also acknowledge Marcelo Buzzi, Helainy Matos and Gabriel Costa Nunes for laboratory support regarding quantitative amino acid analysis. We are grateful to Luiz Guilherme Nadal for statistics support. We would like to express our deep gratitude to the patients and their families for their constant collaboration during our research.

References

- Ahmad, S., Gromiha, M., Fawareh, H. and Sarai, A. ASAView: database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinformatics* **5** (2004), p. 51.
- Ash, D.E., Scolnick, L.R., Kanyo, Z.F., Vockley, J.G., Cederbaum, S.D. and Christianson, D.W. Molecular basis of hyperargininemia: structure-function consequences of mutations in human liver arginase. *Mol Genet Metab* **64** (1998), pp. 243-9.
- Bao, L., Zhou, M. and Cui, Y. nsSNPAnalyzer: identifying disease-associated nonsynonymous single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* **33** (2005), pp. W480-2.
- Bromberg, Y. and Rost, B. SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res* **35** (2007), pp. 3823-35.
- Brusilow, S.W. and Horwich, A.L.: Urea cycle enzymes. In: Scriver, C.R., Sly, W.S., Beaudet, A.L., Childs, B., Valle, D., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (Editors), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York (2001), pp. 1909-1963.
- Cardoso, M.L., Martins, E., Vasconcelos, R., Vilarinho, L. and Rocha, J. Identification of a novel R21X mutation in the liver-type arginase gene (*ARG1*) in four Portuguese patients with argininemia. *Hum Mutat* **14** (1999), pp. 355-6.
- Cederbaum, S.D., Yu, H., Grody, W.W., Kern, R.M., Yoo, P. and Iyer, R.K. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab* **81 Suppl 1** (2004), pp. S38-44.
- Conchillo-Sole, O., de Groot, N.S., Aviles, F.X., Vendrell, J., Daura, X. and Ventura, S.

- AGGREGSCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics* **8** (2007), p. 65.
- Cowley, D.M., Bowling, F.G., McGill, J.J., van Dongen, J. and Morris, D. Adult-onset arginase deficiency. *J Inherit Metab Dis* **21** (1998), pp. 677-8.
- Crombez, E.A. and Cederbaum, S.D. Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. *Mol Genet Metab* **84** (2005), pp. 243-51.
- De Deyn, P.P., Marescau, B., Qureshi, I.A., Cederbaum, S.D., Lambert, M., Cerone, R., Chamoles, N., Specola, N., Leonard, J.V., Gatti, R., Kang, S.S., Mizutani, N., Rezvani, I., Snyderman, S.E., Terheggen, H.G., Yoshino, M., Appel, B., Martin, J.J., Beaudet, A.L., Vilarinho, L., Hirsch, E., Jakobs, K., van der Knaap, M.S., Naito, H., Pickut, B.A., Shapira, S.K., Fuchshuber, A., Roth, B. and Hylan, K.: Hyperargininemia: a treatable inborn error of metabolism? In: De Deyn, P.P., Marescau, B. and Qureshi IA, M.A. (Editors), *Guanidino Compounds in Biology and Medicine*. John Libbey & Company Ltd., London, UK (1997), pp. 53-69.
- Deignan, J.L., De Deyn, P.P., Cederbaum, S.D., Fuchshuber, A., Roth, B., Gsell, W. and Marescau, B. Guanidino compound levels in blood, cerebrospinal fluid, and post-mortem brain material of patients with argininemia. *Mol Genet Metab* **100 Suppl 1** (2010), pp. S31-6.
- Dowling, D.P., Di Costanzo, L., Gennadios, H.A. and Christianson, D.W. Evolution of the arginase fold and functional diversity. *Cell Mol Life Sci* **65** (2008), pp. 2039-55.
- Edwards, R.L., Moseley, K., Watanabe, Y., Wong, L.J., Ottina, J. and Yano, S. Long-term neurodevelopmental effects of early detection and treatment in a 6-year-old patient with argininaemia diagnosed by newborn screening. *J Inherit Metab Dis* (2009).
- Fernandez-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. and Serrano, L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol* **22** (2004), pp. 1302-6.
- Garcia, D., Uribe, E., Lobos, M., Orellana, M.S. and Carvajal, N. Studies on the functional significance of a C-terminal S-shaped motif in human arginase type I: essentiality for cooperative effects. *Arch Biochem Biophys* **481** (2009), pp. 16-20.
- Grody, W.W., Klein, D., Dodson, A.E., Kern, R.M., Wissmann, P.B., Goodman, B.K., Bassand, P., Marescau, B., Kang, S.S., Leonard, J.V. and et al. Molecular genetic study of human arginase deficiency. *Am J Hum Genet* **50** (1992), pp. 1281-90.
- Guerois, R., Nielsen, J.E. and Serrano, L. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations. *J Mol Biol* **320** (2002), pp.

369-87.

- Jain-Ghai, S., Nagamani, S.C., Blaser, S., Siriwardena, K. and Feigenbaum, A. Arginase I deficiency: Severe infantile presentation with hyperammonemia: More common than reported? *Mol Genet Metab* **104** (2011), pp. 107-11.
- Khan, S. and Vihinen, M. Performance of protein stability predictors. *Hum Mutat* **31** (2010), pp. 675-84.
- Krieger, E., Koraimann, G. and Vriend, G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field. *Proteins* **47** (2002), pp. 393-402.
- Lavulo, L.T., Sossong, T.M., Jr., Brigham-Burke, M.R., Doyle, M.L., Cox, J.D., Christianson, D.W. and Ash, D.E. Subunit-subunit interactions in trimeric arginase. Generation of active monomers by mutation of a single amino acid. *J Biol Chem* **276** (2001), pp. 14242-8.
- Lee, B.H., Jin, H.Y., Kim, G.H., Choi, J.H. and Yoo, H.W. Argininemia presenting with progressive spastic diplegia. *Pediatr Neurol* **44** (2011), pp. 218-20.
- Linding, R., Russell, R.B., Neduva, V. and Gibson, T.J. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res* **31** (2003), pp. 3701-8.
- Pey, A.L., Stricher, F., Serrano, L. and Martinez, A. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *Am J Hum Genet* **81** (2007), pp. 1006-24.
- Prasad, A.N., Breen, J.C., Ampola, M.G. and Rosman, N.P. Argininemia: a treatable genetic cause of progressive spastic diplegia simulating cerebral palsy: case reports and literature review. *J Child Neurol* **12** (1997), pp. 301-9.
- Scaglia, F. and Lee, B. Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **142C** (2006), pp. 113-20.
- Shishova, E.Y., Di Costanzo, L., Emig, F.A., Ash, D.E. and Christianson, D.W. Probing the specificity determinants of amino acid recognition by arginase. *Biochemistry* **48** (2009), pp. 121-31.
- Simoni, R.E., de Oliveira, C.P., Braga, M.J., de Menezes, C.R., Llerena Junior, J.C., Correia, P.S., Rosa, A.A., Horovitz, D.G., Chaves, C.R. and de Oliveira, M.L. Hyperargininaemia: a late-diagnosed Brazilian case with increased urinary excretion of homocystine. *J Inherit Metab Dis* **20** (1997), pp. 715-6.
- Thusberg, J. and Vihinen, M. Pathogenic or not? And if so, then how? Studying the effects of

- missense mutations using bioinformatics methods. *Hum Mutat* **30** (2009), pp. 703-14.
- Tokuriki, N., Stricher, F., Schymkowitz, J., Serrano, L. and Tawfik, D.S. The stability effects of protein mutations appear to be universally distributed. *J Mol Biol* **369** (2007), pp. 1318-32.
- Uchino, T., Haraguchi, Y., Aparicio, J.M., Mizutani, N., Higashikawa, M., Naitoh, H., Mori, M. and Matsuda, I. Three novel mutations in the liver-type arginase gene in three unrelated Japanese patients with argininemia. *Am J Hum Genet* **51** (1992), pp. 1406-12.
- Uchino, T., Snyderman, S.E., Lambert, M., Qureshi, I.A., Shapira, S.K., Sansaricq, C., Smit, L.M., Jakobs, C. and Matsuda, I. Molecular basis of phenotypic variation in patients with argininemia. *Hum Genet* **96** (1995), pp. 255-60.
- Van Durme, J., Delgado, J., Stricher, F., Serrano, L., Schymkowitz, J. and Rousseau, F. A graphical interface for the FoldX forcefield. *Bioinformatics* **27** (2011), pp. 1711-2.
- Vockley, J.G., Goodman, B.K., Tabor, D.E., Kern, R.M., Jenkinson, C.P., Grody, W.W. and Cederbaum, S.D. Loss of function mutations in conserved regions of the human arginase I gene. *Biochem Mol Med* **59** (1996), pp. 44-51.
- Vockley, J.G., Tabor, D.E., Kern, R.M., Goodman, B.K., Wissmann, P.B., Kang, D.S., Grody, W.W. and Cederbaum, S.D. Identification of mutations (D128G, H141L) in the liver arginase gene of patients with hyperargininemia. *Hum Mutat* **4** (1994), pp. 150-4.
- Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F. and Jones, D.T. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J Mol Biol* **337** (2004), pp. 635-45.
- Wei, Q., Wang, L., Wang, Q., Kruger, W.D. and Dunbrack, R.L., Jr. Testing computational prediction of missense mutation phenotypes: functional characterization of 204 mutations of human cystathionine beta synthase. *Proteins* **78** (2010), pp. 2058-74.
- Yue, P., Melamud, E. and Moulton, J. SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies. *BMC Bioinformatics* **7** (2006), p. 166.

Table 1. Arginase activity in erythrocytes, blood arginine concentration, *ARG1* mutation and main clinical data of 16 patients with hyperargininemia.

Patient*	Gender, age (yr)	Consanguinity	Arginase activity (U/L) (^a)	Blood arginine concentration (μM)	<i>ARG1</i> mutation	First neurologic sign	LLS onset / Age of gait loss (yr)	Age of seizure onset (yr)	Other neurological feature	Mental Retardation
1	M, 12	No	0.9 (9.4)	397	p.T134I / p.T134I	21 mo, LLS	3	4		Severe
2	M, 12	No	1.0 (10.1)	547	p.T134I / p.T134I	22 mo, LLS	3	7		Severe
3	M, 24	Yes (2nd cousins)	0.0 (0.0)	506	p.T134I / p.T134I	15 mo, LLS	5	3		Severe
4	M, 25	Yes (2nd cousins)	1.0 (10.1)	573	p.T134I / p.T134I	16 mo, LLS	6	2		Moderate
5	F, 24	Yes (2nd cousins)	0.5 (5.2)	572	p.T134I / p.T134I	33 mo, seizure	4 / 13	3		Moderate
6	F, 37	Yes (1st cousins)	0.4 (4.2)	423	p.T134I / p.T134I	7 yr, LLS	27	22		Mild
7	M, 31	No	0.2 (2.1)	388	p.T134I / p.T134I	4 yr, seizure	5 / 16	4		Mild
8	M, 21	No	0.9 (9.4)	753	p.R21X / p.G74V	3 yr, LLS	5	5		Severe
9	M, 28	No	0.6 (6.3)	567	p.R21X / p.W122X	24 mo, ULT	10 / 14	10	ataxia	Mild
10	F, 16	Yes (1st cousins)	0.5 (5.2)	420	p.G27D / p.G27D	3 mo, seizure	2.5 / No	0.25		Moderate
11	M, 17	No	0.8 (8.3)	355	p.R21X / p.I11T	4 yr, LLS	9	6		Moderate
12	M, 7	No	0.9 (9.4)	685	p.R21X / p.R21X	3 yr, LLS	6	No		Moderate
13	F, 13	Yes (2nd cousins)	0.0 (0.0)	509	p.R21X / p.R21X	17 mo, LLS	4	4	choreic movements	Severe
14	M, 11	No	2.0 (20.8)	314	p.R308Q / p.R308Q	18 mo, LLS	7	9		Moderate
15	M, 31	Yes (1st cousins)	1.3 (13.5)	343	p.R308Q / p.R308Q	10 yr, LLS	13	30	involuntary tremor	Mild
16	M, 15	No	1.1 (11.5)	431	p.R308Q / p.I174fs179	14 mo, LLS	13	2	hyperactivity / ataxia	Moderate
Controls [mean ± SD]			9.6 ± 2.8 (n=46) ^b	106 ± 18 (n=15) ^c						

* Sibpairs: patients 1 & 2 (monozygotic twin brothers), 3 & 4.

a: % of control mean; b: control range values = 4.2-14.8 U/L or μM/min/L; c: control range values = 74-129 μM

M: male; F: female; mo: months; yr: years; LLS: lower limb spasticity; ULT: upper limb ataxic tremor.

Table 2. Predicted pathogenicity of *ARG1* missense mutations and their effect on protein stability by FoldX.

Mutant	Report	Pathogenic or not			FoldX*
		nsSNPAnalyzer	SNAP	SNPs3D	$\Delta\Delta G \pm SD$ kcal/mol
Effect on the stability of the enzyme					
p.G235R	Uchino et al.,1992	P	P	P	11.1 ± 0.4
p.I11T	Uchino et al.,1995	P	P	P	3.5 ± 0.0
p.G138V	Uchino et al.,1995	P	P	P	11.1 ± 0.4
p.G98S	Jain-Ghai et al.,2011	P	P	P	7.5 ± 0.9
p.A298P	Jain-Ghai et al.,2011	N	N	P	3.6 ± 0.1
p.G305R	Lee et al., 2011	P	P	P	7.1 ± 1.0
p.G27D	novel	P	P	P	8.8 ± 0.2
p.G74V	novel	P	N	N	14.4 ± 0.7
Effect on the enzyme active site					
p.D128G	Vockley et al.,1994	P	P	P	-3.7 ± 0.1
p.H141L	Vockley et al.,1994	P	P	P	2.3 ± 1.0
p.G142E	Edwards et al.,2009	P	P	P	-1.1 ± 0.1
p.D234H	Jain-Ghai et al.,2011	P	P	P	0.9 ± 0.5
p.T134I	novel	P	P	P	0.9 ± 0.0
Effect on the monomer / trimer equilibrium					
p.R308Q	novel	N	P	U	0.4 ± 0.1
Neutral					
p.T290S	Grody et al.,1992	N	N	N	0.1 ± 0.0

* Mutations presenting a $\Delta\Delta G > 3$ kcal/mol are considered greatly destabilising (Van Durme et al., 2011).

P, Pathogenic; N, Non-pathogenic; U, Unable to perform analysis.

Figure 1. Primary structure of the ARG1 protein and missense mutations involved in hyperargininemia. Multiple alignment of the homologous ARG1 protein sequences in different species with annotated catalytically relevant amino acids and hyperargininemia

missense mutations. Amino acids involved in substrate catalysis: (+) Bind effectively to the substrate, (M) Mn^{2+} First-shell metal ligands, (m) Mn^{2+} Second-shell metal ligands.

Mutations: (■) p.I11T, (●) p.G27D, (○) p.G74V, (Δ) p.G98S, (▣) p.D128G, (◇) p.T134I, (x) p.G138V, (#) p.H141L, (↓) p.G142E, (||) p.D234H, (F) p.G235R, (\$) p.A298P, (Y) p.G305R, (▼) p.R308Q. Conserved amino acid residues and conservative substitutions are highlighted in dark grey and grey, respectively.

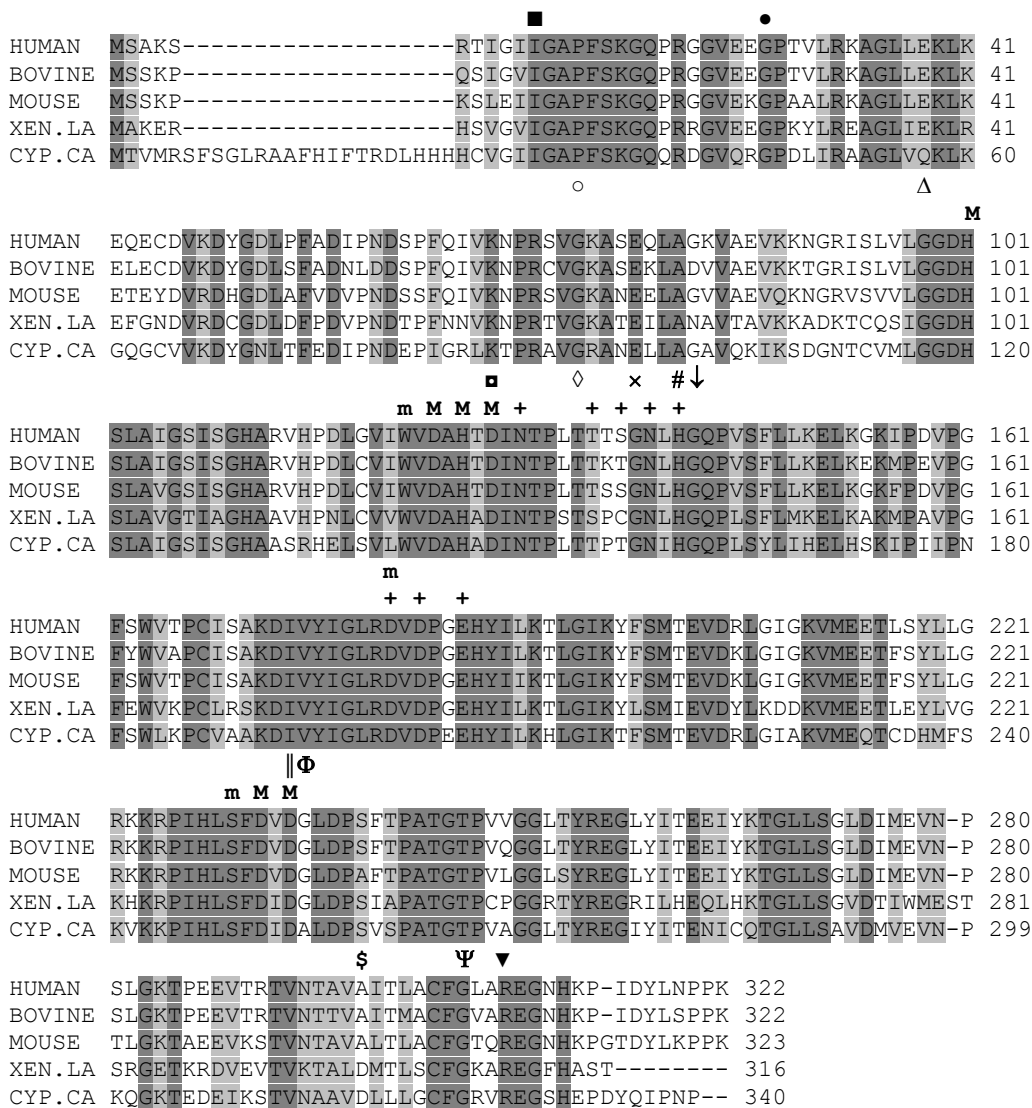


Figure 2. Structural consequences of p.G74V and p.G27D mutations on the human arginase I protein (PDB 2AEB). (a) Substitution of Gly74 with Val74 in the p.G74V mutant ARG1. (b) Introduction of van der Waals clashes with the backbone of Gly161, resulting in great destabilisation of the enzyme ($\Delta\Delta G = 14.4 \pm 0.7$ kcal/mol). (c) Substitution of Gly27 with Asp27 in p.G27D mutant ARG1. (d) Destabilisation of the folded conformation through the introduction of side-chain clashes with Gly98 and an unsolvated carboxyl group in the protein hydrophobic core ($\Delta\Delta G = 8.8 \pm 0.2$ kcal/mol).

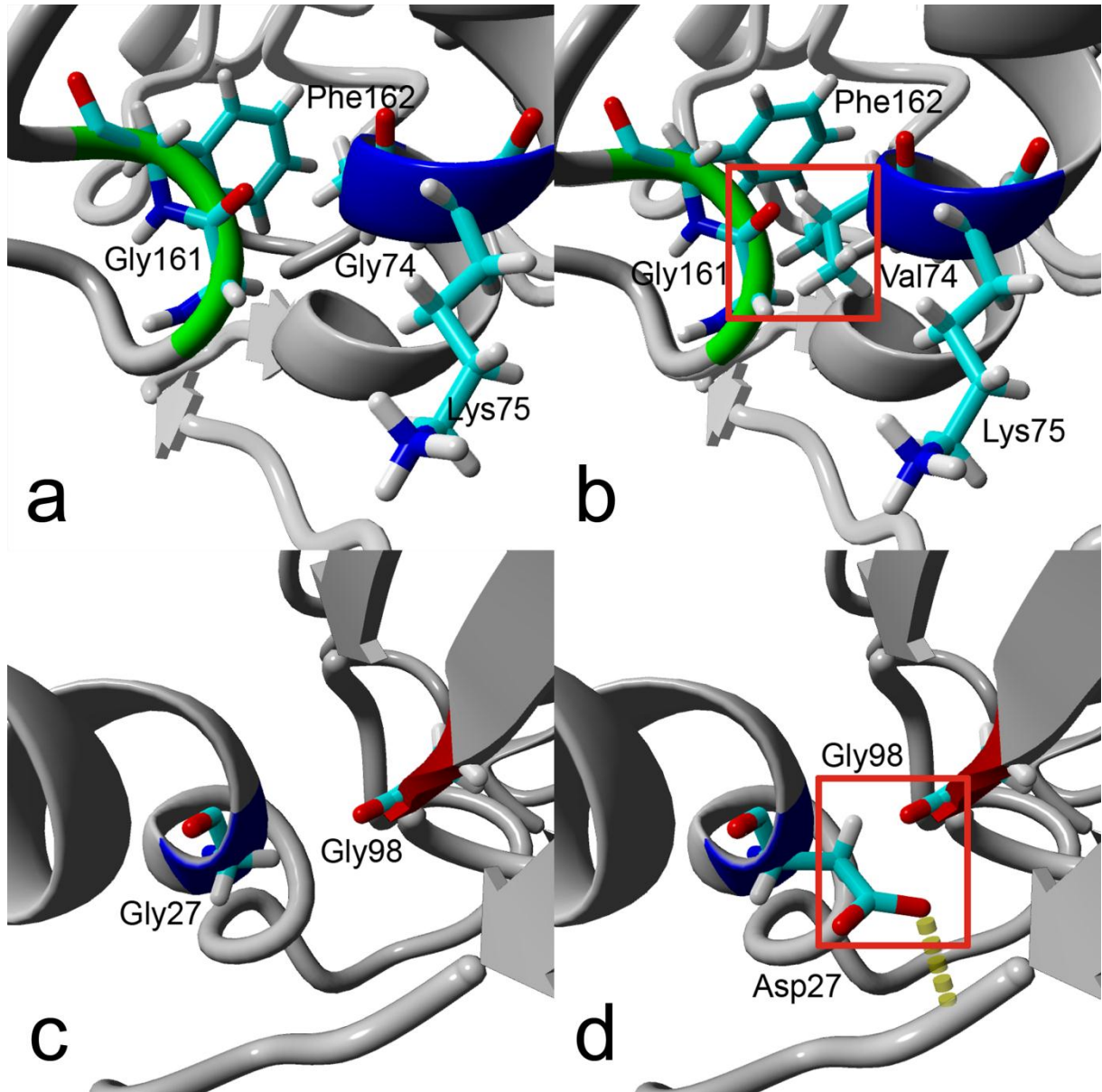


Figure 3. Relevance of Thr134 to the structure of the wild-type ARG1 substrate-binding pocket (PDB 2AEB). Thr134 interacts with Asn130 and Asp183, which are directly implicated in substrate binding. Abh = 2(S)-amino-6-boronoheptanoic acid.

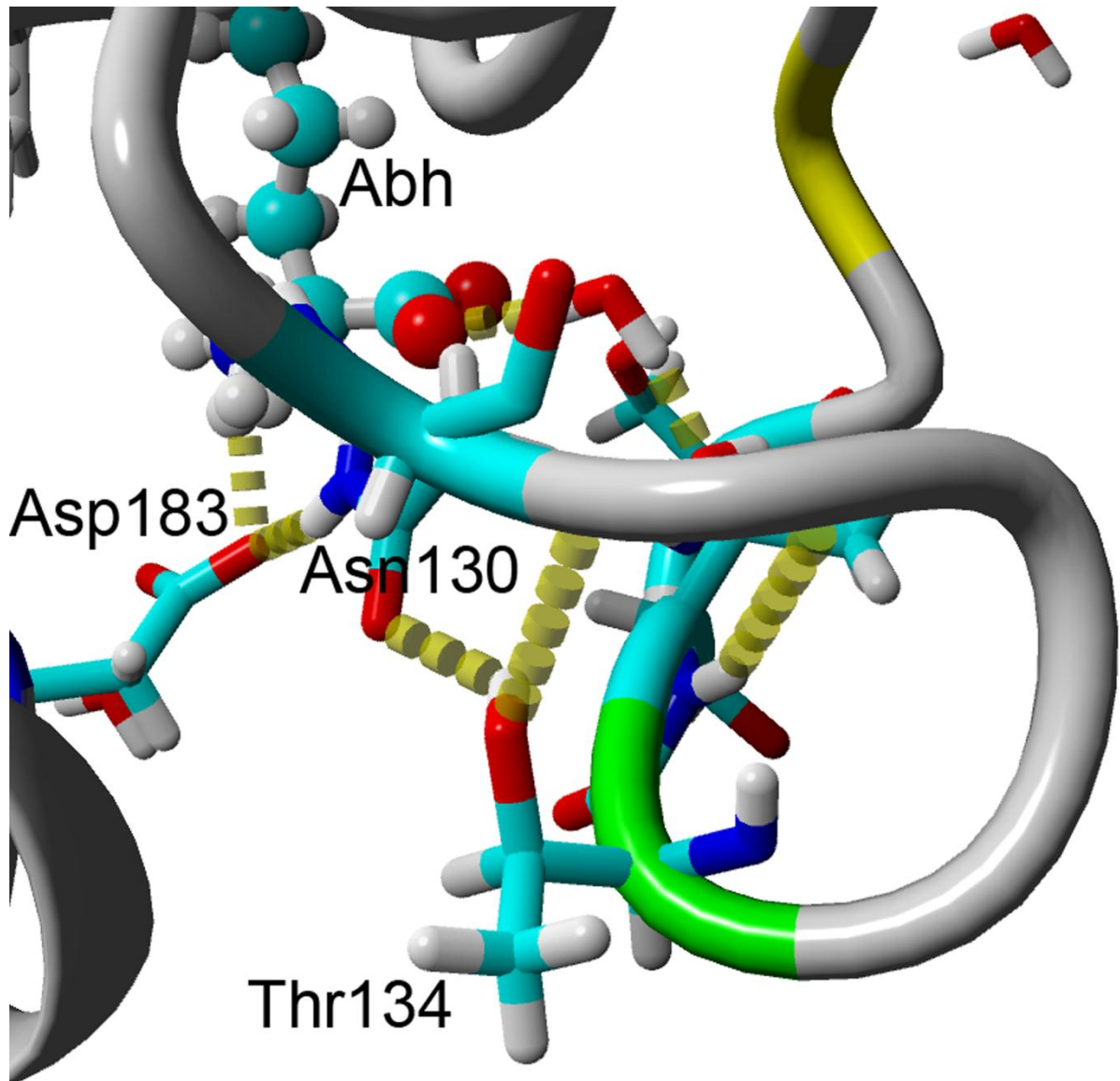


Figure 4. Effect of the p.R308Q mutation on the interface of rat liver arginase I monomer interactions (PDB 1RLA). (a) In wild-type ARG1, Arg308, Glu262 and Arg255 from monomer A (yellow) are connected by a network of salt bridges to Glu262 and Asp204 of monomer B (grey). (b) In the p.R308Q mutant ARG1, Gln308 from monomer A establishes an intramonomer salt bridge with Glu262 but does not bind to Asp204 of monomer B, lowering their interaction energy (ΔG_{int}) by 3.5 kcal/mol, according to FoldX.

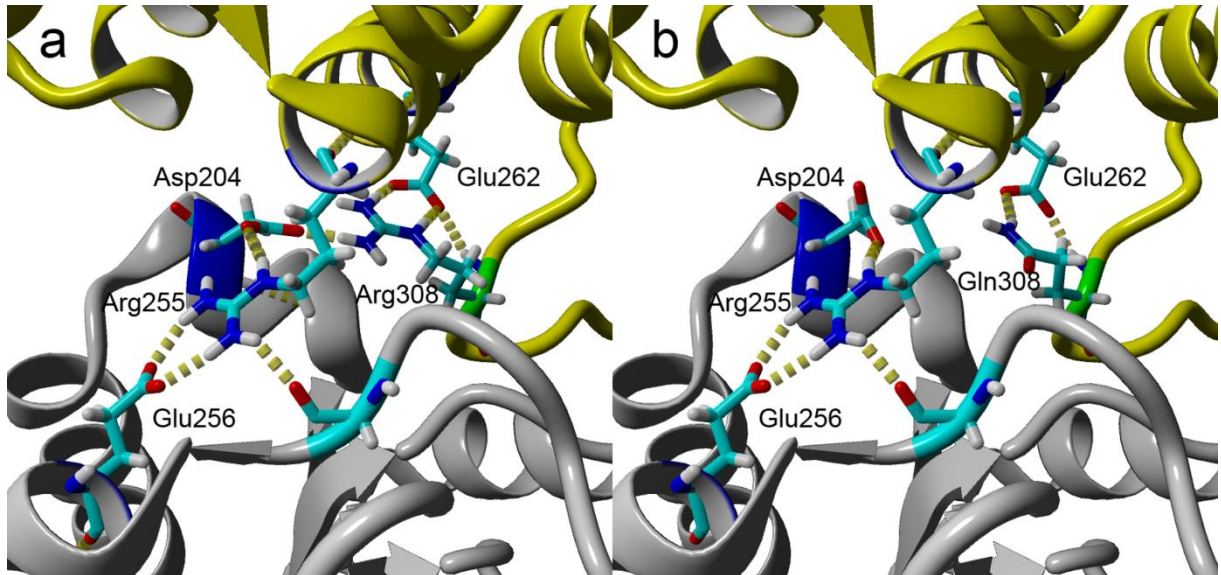


Table S1. Primers sequences and PCR conditions.

Exon	Oligonucleotide sequence	Annealing Temperature (°C)	MgCl ₂ concentration (mM)
1	Forward: 5'-TGACTGACTGGAGAGCTCAAG-3' Reverse: 5'-TAACTAGACAATAACACCTTACA-3'	55	1.5
2	Forward: 5'-CCTGGCTCTGTAGGAGCTCAA-3' Reverse: 5'-CTTCAGAGTGGGGAGGAAAATC-3'	55	1.5
3	Forward: 5'-AACTTTTTAATTTTAGAGTGTGA-3' Reverse: 5'-ACACAGTTATTCAACAAGACC-3'	55	2.0
4	Forward: 5'-ATATGATGTATGTAGTGACAC-3' Reverse: 5'-ATGTCTACTAAAAAGTATTCT-3'	50	1.5
5	Forward: 5'-TCAAGAGAATCATAcataacc-3' Reverse: 5'-CCTAGAGTTTTCAAATGTAGC-3'	55	1.5
6	Forward: 5'-ATTTCCCTTAAAAGGAGACAG-3' Reverse: 5'-AACTTTGGTTGTCAGTAGCAA-3'	55	1.5
7	Forward: 5'-GAAATGTGAAGCCATCAACCT-3' Reverse: 5'-TATCTAATCCTGAGAGTAGCC-3'	50	2.0
8	Forward: 5'-ATTACAATTTGTTGTTGTAG-3' Reverse: 5'-TTGAATTTTACACCAAGAGGG-3'	47	2.0

ARTIGO 3

Brain MRI and magnetic resonance spectroscopy findings in patients with hyperargininemia.

Brain MRI and MRS findings in patients with hyperargininemia.

Daniel R Carvalho^{1,2}, MD, MSc

Luciano Farage², MD

Bernardo JAF Martins¹, MD

Jaime M Brum¹, MD, PhD

Carlos E Speck-Martins¹, MD, PhD

Riccardo Pratesi², MD, PhD

1- SARA Network of Rehabilitation Hospitals, Brasilia, DF, Brazil.

2- School of Medicine, Brasilia University, Brasilia, DF, Brazil.

The authors report no financial interest or conflicts of interest related to the manuscript.

Corresponding author: Dr. Daniel R. Carvalho, Genetic Unit, SARA Rehabilitation Hospital, SMHS Quadra 501 Conj. A, Brasília-DF, 70335-901, Brazil. Tel.: +55-61-3319-1111; fax: +55-61-3319-1538; e-mail: danielcarvalho@sarah.br

ABSTRACT

Background and Purpose: Hyperargininemia (HA) is a rare autosomal recessive metabolic disorder and neuroimaging features have been seldom reported. Hyperammonemic encephalopathy is uncommon in HA and clinical presentation is distinct from that other urea cycle disorders. The brain MRI findings and the MRS study of a series of Brazilian patients are described.

Methods: MR images of the brain were obtained in 8 male and 2 female patients with classic HA phenotype. Six patients were evaluated twice. Single-voxel ^1H -MR spectroscopy was performed in 6 patients.

Results: Only one patient with less severe neurological signs showed MRI images that were completely normal. A variable degree of cerebral atrophy was noted in all other patients. Three patients also presented with mild signs of cerebellar atrophy. MRS shows no metabolic abnormality.

Conclusions: We presented the MRI and MRS findings of a large series of HA patients. It was noted variable degree of brain atrophy and mild cerebellar atrophy. These findings are not specific. No metabolic abnormality in MRS was observed in our series.

INTRODUCTION

Hyperargininemia (HA, OMIM #207800) is a rare autosomal recessive metabolic disorder caused by a deficiency in arginase I (ARG1), the final enzyme in the urea cycle metabolic pathway which is responsible for the clearance of waste nitrogen resulting from protein turnover. ARG1 catalyzes the conversion of arginine to urea plus ornithine.¹ HA is a pan-ethnic disease with an estimated incidence of 1 in 2 million live births. In contrast to other disorders associated with the urea cycle, episodes of hyperammonemic encephalopathy are rarely observed in the common clinical presentation of HA. The HA patients typically have an insidious onset and manifest a progressive neurological syndrome consisting of spastic paraplegia, cognitive deficit and epilepsy in childhood.²⁻⁴ The neuropathogenesis of HA is poorly understood; however, some metabolites of arginine, such as guanidine compounds and nitric oxide, may be involved in neurotoxic effects during brain development and sporadic hyperammonemia is unrelated to brain injury.^{3,5,6}

Neuroimaging features have been rarely reported in patients with HA. Neuroimaging abnormalities may even be absent, depending on the duration of disease manifestation. The most frequent neuroimaging finding reported in HA patients is cerebral and/or cerebellar atrophy.^{1,7} Multicystic encephalomalacia was described in one case of HA with a long-term survival.⁸ Magnetic resonance spectroscopy (MRS) showed increased glutamate/glutamine peak in two uncommon acute cases of HA presenting in neonates,^{7,9} and similar peak has been noted in other urea cycle defects.¹⁰ Recently, an abnormal brain MRS single voxel peak at 3.8 ppm was described in a study of two siblings presenting with classical infantile HA.¹¹ It was suggested that this peak represented an arginine deposition;¹¹ however, this finding has not been replicated in other patients.

In this study, we describe the brain MRI findings in a series of ten Brazilian patients with the classic HA phenotype, which included an examination of six patients at two stages during the course of the disease. MRS was also performed in six of the patients.

METHODS

Patients

Ten HA patients (8 male and 2 female) from two different geographic regions of Brazil were retrospectively evaluated at a network of public rehabilitation hospitals during neurological treatment for spastic paraparesis. The diagnosis of HA was confirmed using three criteria: (1) very low or absent ARG1 activity in erythrocytes; (2) a blood arginine level at least three times higher than the mean level of healthy individuals; and (3) confirmation of mutant alleles of *ARG1* gene. Further explanation of the diagnostic procedures is detailed elsewhere (submitted article). All patients had the classic HA phenotype with clinical onset of signs during childhood. Mean age at MRI evaluation was 18.5 years old (range 6 to 37 years old). All patients were alive at the end of the study (February 2012) and each patient was the only case of HA in their family, except for one pair of siblings. All patients were on hypoproteic diet. None of the patients were using arginine-free essential amino acid specialized formula or oral sodium benzoate before neuroimaging examinations were performed. Informed consent was obtained from the legal guardian of each participant after the study was approved by the local Institutional Review Board.

Neuroimaging

Magnetic resonance imaging

Brain MR images were obtained from the ten patients during outpatient follow-up. Six of the ten patients were evaluated twice, with the intervals between examinations varying from 3 to 10 years (total of 16 examinations). Most examinations (n = 12) were acquired on a 1.5T MR

imaging scanner: 3 examinations on a Siemens Magnetom Vision (Siemens, Erlangen, Germany) and 9 examinations on a GE Signa MR (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA). Four examinations were acquired on the 3T MR GE Signa HDxt (GE Healthcare). The 1.5T and 3T evaluations included at least sagittal SE T1, axial FLAIR, FSE T2, T2* and diffusion images.

Four patients also underwent whole spinal MRI scans during workup evaluation. All of the conventional images were analyzed by two board certified radiologists with at least five years of experience. Any discrepancies in the evaluations were resolved by consensus.

Magnetic resonance spectroscopy

Single-voxel ^1H -MRS was performed on six patients between January 2010 and August 2011 using a 2 x 2 x 2 cm (8 ml) region of interest (ROI). The ROI was centered in the normal-appearing white matter of the right parietal lobe, and MRS was performed using a point-resolved spectroscopy sequence (PRESS) protocol with short echo time (31 - 35 ms) and long echo time (136 - 144 ms). All spectra were obtained using automatic MRS software (AW 4.5 workstation, GE Healthcare) with a spin-echo technique, TR of 1500 ms at 1.5T and 2000 ms at 3T, 1024 point acquisition, 1000 Hz bandwidth, 128 averages and chemical shift selection suppression (CHESS). We evaluated for the presence of an anomalous peak at 3.8 ppm, the alpha and beta glutamine (Gln) plus glutamate (Glu) peak [Glx], the presence or absence of a myoinositol peak and abnormal relation between the choline (Cho), myoinositol (mI), creatine (Cr) and *N*-acetyl-aspartate (NAA) peaks. A peak at 3.8 ppm was considered abnormal if it was higher than the mI or Cho peak. Spectra evaluation included the qualitative analysis and determination of metabolite ratios relative to creatine. Creatine is usually stable during life and also in many pathological processes. No patients had signs of hyperammonemia. Serum level of ammonia was measured at the time of the MRS study and serum levels of arginine, glutamine and glutamate were quantified on the same day by mass spectrometry.

RESULTS

The main clinical features and brain neuroimaging findings of the ten patients with the classic clinical presentation of HA are summarized in Table 1. Only one patient showed normal brain MRI images (patient 7), who presented with later onset disease and less severe neurological signs than the other patients. A variable degree of cerebral atrophy was noted during the evaluation of the other patients (Fig. 1A, B and C). Three patients also presented mild signs of cerebellar atrophy (Fig. 1D). All patients presented normal white matter signals, except for patient 4. A bilateral increase in the FLAIR hyperintensity of the white matter adjacent to the frontal horns of the lateral ventricles was observed in this patient, which seemed to be nonspecific.

Six patients underwent brain MRI examinations at two stages during their disease course. Evident changes were only observed in the brain MR images of the siblings (patients 5 and 6, Table 1), who had the longest intervals between the first and second examination. The emergence of cerebral atrophy was noted in the second examination of patient 5, and a slight increase in brain atrophy was observed in the second examination of patient 6, compared to their initial examinations (Fig. 2).

All six patients had a normal serum ammonia value at the time of the MRS study. The MRS study data and the serum levels of arginine, glutamine and glutamate for the six HA patients are presented in Table 2. There was a minimal increase in the serum glutamine/glutamate levels of three patients; however, these increases were considered to be non-significant. Although we observed a peak at 3.8 ppm in four patients, these peaks were not considered abnormal as they were equal to or lower than the mI or Cho peaks. In fact, the 3.8 ppm peaks did not differ from the other small baseline peaks, and this result was reinforced at a long-echo time (136 - 144 ms). The spectra of the six patients are shown in

Figure 3, and were considered unremarkable by both observers. The ratios of each metabolite with creatine were listed in Table 2, and no significant differences were noted.

Four patients underwent a spinal cord MRI, and the images were considered unremarkable except for disc protrusion in two cases.

DISCUSSION

Only a small number of case series of HA patients have been reported. Neuroimaging features have been seldom reported in HA, and these findings are usually described in the context of case reports in literature. This study describes the neuroimaging findings of the largest series of patients with this rare metabolic disease.

The HA patients reported in this study presented with the typical clinical features of spastic diplegia, cognitive deterioration and epilepsy. Compared with other urea cycle disorders, the distinct development of progressive spastic diplegia suggests that a specific pathogenic mechanism occurs at the brain level in HA. However, we observed the nonspecific brain abnormalities which have previously been reported in HA patients.¹⁻⁴ Variable cerebral atrophy was noted in a large proportion of the patients and mild cerebellar atrophy was observed in a small number of the patients. No spinal cord abnormalities were observed. Though brain MRI findings are not useful for diagnostic purposes in this metabolic disorder, HA can be confused with cerebral palsy and brain MRI examinations may be helpful for evaluation of a differential diagnosis.^{2,4}

Recently, an investigation of two siblings suggested that MRS may possibly assist in the diagnosis of HA. Gungor et al. described the occurrence of an abnormal MRS peak at 3.8 ppm, which was interpreted as arginine deposit.¹¹ We were not able to perform a MRS examination in all of the individuals in this series; however, a reasonable number of patients were assessed using exactly the same protocol described by the previous study.¹¹ We did not

observe an abnormal MRS peak at 3.8 ppm during the analysis of any of the six patients, all of whom had the classic clinical presentation of HA during infancy. We cannot exclude the possibility that the 3.8 ppm peak is transient and was not observed in our study.

Gungor et al. suggested that the abnormal 3.8 ppm peak consisted mostly of arginine, as the patients had elevated arginine levels and normal serum and cerebrospinal fluid (CSF) glutamine/glutamate values.¹¹ However, it is important to remember that the concentration of a given metabolite in CSF does not match the brain tissue concentration. It is not possible to exclude the possibility that the abnormal 3.8 ppm peak was confused with the 3.9 ppm creatine peak (CH₂). Additionally, this study and previous MRS analyses in HA patients may lack specificity, as they rely on the manufacturer's software data processing. The use of more powerful tools for spectral analysis and a phantom study may be necessary to confirm if the 3.8 ppm peak is real and whether it represents arginine.

Previous MRS studies described an abnormal glutamine/glutamate (Glx) peak at 2.05-2.55 and 3.65-3.85 ppm in patients with other urea cycle disorders.^{11,13} Additionally, an abnormal Glx peak was also reported in patients with a severe neonatal presentation of HA.^{7,10} Beside an abnormal Glx peak in patient with neonatal presentation of HA, it could be shown that glutamine CSF to plasma ratio is elevated.^{7,10} It is possible that the underlining mechanism of urea cycle disorders, including HA, is linked to a hyperosmolar state, similar to that observed in hepatic encephalopathy which is characterized by a low mI and high Glx.¹⁴

Some patients were taking baclofen and/or anticonvulsants, but we do not think that it may cause any influence in the image findings. Only two patients were using medication at the time of the MRS study. We do not believe that the treatment may have influenced the results of MRS because serum arginine levels remained elevated in all patients despite of the low protein diet.

Several limitations of our study should be considered. It was not possible to measure the CSF levels of arginine, glutamine and glutamate in our patients. MRI evaluation was performed in two patients at a young age (before 10 years old), and it is possible that some brain abnormalities are not yet present at this age. Due to the fact that this is a study of a rare disease, it was inevitable that the neuroimaging data were acquired on different scanners of 1.5T and 3T. Both field strength scanners seemed to be good enough to detect the alterations in these patients with HA. Field strength difference could be a bias in MRS data, as a 3T scanner provides better signal to noise ratio and separation between choline and creatine peaks.

In conclusion, this study presents the MRI findings of a large series of HA patients, in which no distinctive neuroimaging finding was observed. We could not reproduce the previously reported finding of an abnormal MRS peak at 3.8 ppm in our series of patients with the common clinical presentation of HA. Additional MRS investigations of HA patients are necessary to confirm the lack of abnormalities in patients without hyperammonemic crisis. The use of qualitative MRS techniques may help in the study of the pathogenesis of HA.

REFERENCES

1. Scaglia F, Lee B. Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006;142C:113-120.
2. Prasad AN, Breen JC, Ampola MG, Rosman NP. Argininemia: a treatable genetic cause of progressive spastic diplegia simulating cerebral palsy: case reports and literature review. *J Child Neurol* 1997;12:301-309.
3. Crombez EA, Cederbaum SD. Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. *Mol Genet Metab* 2005;84:243-251.

4. Lee BH, Jin HY, Kim GH, Choi JH, Yoo HW. Argininemia presenting with progressive spastic diplegia. *Pediatr Neurol* 2011;44:218-220.
5. Deignan JL, De Deyn PP, Cederbaum SD, et al. Guanidino compound levels in blood, cerebrospinal fluid, and post-mortem brain material of patients with argininemia. *Mol Genet Metab* 2010;100 Suppl 1:S31-36.
6. Oldham MS, VanMeter JW, Shattuck KF, Cederbaum SD, Gropman AL. Diffusion tensor imaging in arginase deficiency reveals damage to corticospinal tracts. *Pediatr Neurol* 2010;42:49-52.
7. Jain-Ghai S, Nagamani SC, Blaser S, Siriwardena K, Feigenbaum A. Arginase I deficiency: Severe infantile presentation with hyperammonemia: More common than reported? *Mol Genet Metab* 2011;104:107-111.
8. Segawa Y, Matsufuji M, Itokazu N, et al. A long-term survival case of arginase deficiency with severe multicystic white matter and compound mutations. *Brain Dev* 2011;33:45-48.
9. Picker JD, Puga AC, Levy HL, et al. Arginase deficiency with lethal neonatal expression: evidence for the glutamine hypothesis of cerebral edema. *J Pediatr* 2003;142:349-352.
10. Choi CG, Yoo HW. Localized proton MR spectroscopy in infants with urea cycle defect. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22:834-837.
11. Gungor S, Akinci A, Firat AK, Tabel Y, Alkan A. Neuroimaging findings in hyperargininemia. *J Neuroimaging* 2008;18:457-462.
12. Kojic J, Robertson PL, Quint DJ, Martin DM, Pang Y, Sundgren PC. Brain glutamine by MRS in a patient with urea cycle disorder and coma. *Pediatr Neurol* 2005;32:143-146.

13. Rovira A, Alonso J, Cordoba J. MR imaging findings in hepatic encephalopathy. *AJNR*
Am J Neuroradiol 2008;29:1612-1621.

Table 1. The brain neuroimaging findings and main clinical features of 10 patients with hyperargininemia.

Patient	Gender age (y)	Age at exam (y)	MRI system	cerebral atrophy	cerebellar atrophy	Age of gait acquisition (m) /loss (y)	Neurological signs onset	Age of seizures onset	Functional skills in daily life
1	F, 24	23	GE 1.5T	+	-	12 > 13	33 m, S	33 m	L
2	M, 21	7	Siemens 1.5T	+	-	12 > 5	36 m, LLS	5 y	F
3	M, 11	6	GE 1.5 T	+	-	16 > 7	18 m, LLS	9 y	L
4	M, 28	25	GE 1.5 T	+	+	12 > 14	24 m, ULT	10 y	R
5	M, 25	14	GE 1.5 T	-	-	13 > 6	16 m, LLS	2 y	L
		24	GE 3T	+	-				
6	M, 24	13	GE 1.5 T	+	-	13 > 5	15 m, LLS	3 y	F
		22	GE 3T	+	-				
7	F, 37	18	Siemens 1.5T	-	-	28 > 27	7 y, LLS	22 y	R
		37	GE 1.5T	-	-				
8	M, 31	21	Siemens 1.5T	+	+	8 > 16	4 y, S	4 y	R
		31	GE 3T	+	+				
9	M, 17	14	GE 3T	+	-	17 > 9	4 y, LLS	6 y	L
		17	GE 1.5T	+	-				
10	M, 31	11	GE 1.5 T	+	-	12 > 13	10 y, LLS	30 y	R
		16	GE 1.5 T	+	-				

m, months; y, years

M, male; F, female; S, seizures; LLS, lower limb spasticity; ULT, upper limb tremor

R, able to read; L, able to oral language; F, only able to feed

+, present; -, absent

Siblings: patients 5 and 6

Table 2. Data on MRS study patients and serum levels of ammonia, arginine, glutamine and glutamate of 6 patients with hyperargininemia.

Patient	Gender	Age at exam (y)	MRI scanner	Metabolites ratios			Ammonia μM	Arginine μM	Glutamine μM	Glutamate μM	Medication
				NAA/Cr	Cho/Cr	mI/Cr					
1	F	23	GE 1.5T	1.60	0.90	0.50	36	572	756	39	No
5	M	24	GE 3T	1.68	0.90	0.67	44	573	989	16	No
6	M	22	GE 3T	1.50	0.64	-	45	503	1010	15	No
7	F	37	GE 1.5T	1.67	0.90	0.53	30	423	745	90	Phenobarbital
8	M	31	GE 3T	1.73	0.79	0.43	47	388	1150	25	Baclofen
9	M	17	GE 1.5T	1.76	0.70	0.50	49	355	759	135	No
Controls [mean of 15 \pm SD]								106 \pm 18	833 \pm 161	71 \pm 26	

y, years; NAA, *N*-acetyl-aspartate; Cho, choline; Cr, creatine; mI, myoinositol.

FIGURE 1. Examples of various degrees of cerebral atrophy in axial T2WI of patients with hyperargininemia. (A) Patient 9, 17 years old; (B) Patient 10, 11 years old; (C) Patient 4, 25 years old. Mild cerebellar atrophy is observed in the sagittal T1 image. (D) Patient 8, 21 years old.

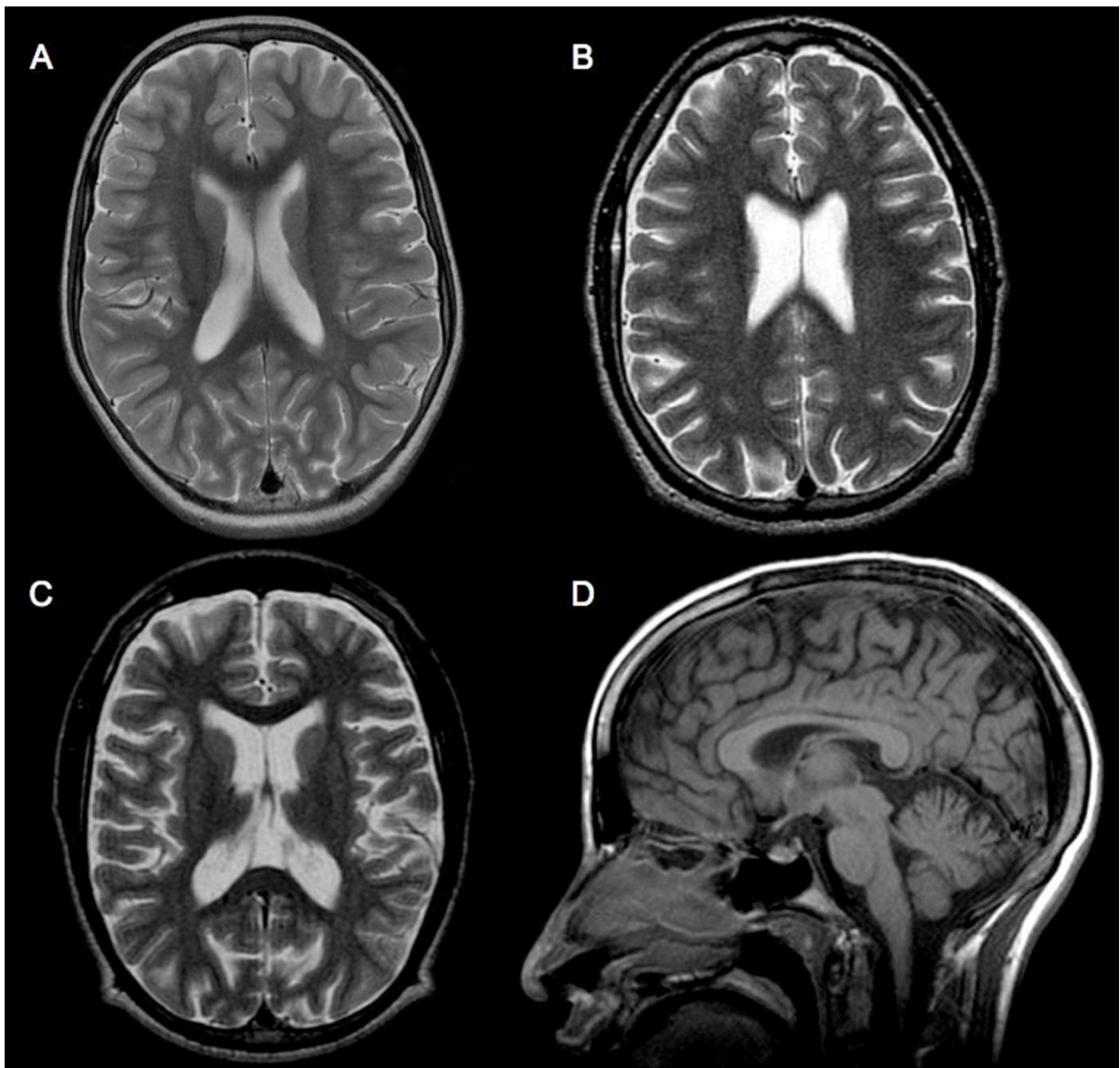


FIGURE 2. Comparative brain MRI images (axial T2WI) of patient 6 showing a slight increase in cerebral atrophy at two different stages during the disease course of hyperargininemia. (A) 13 years old; (B) 22 years old.

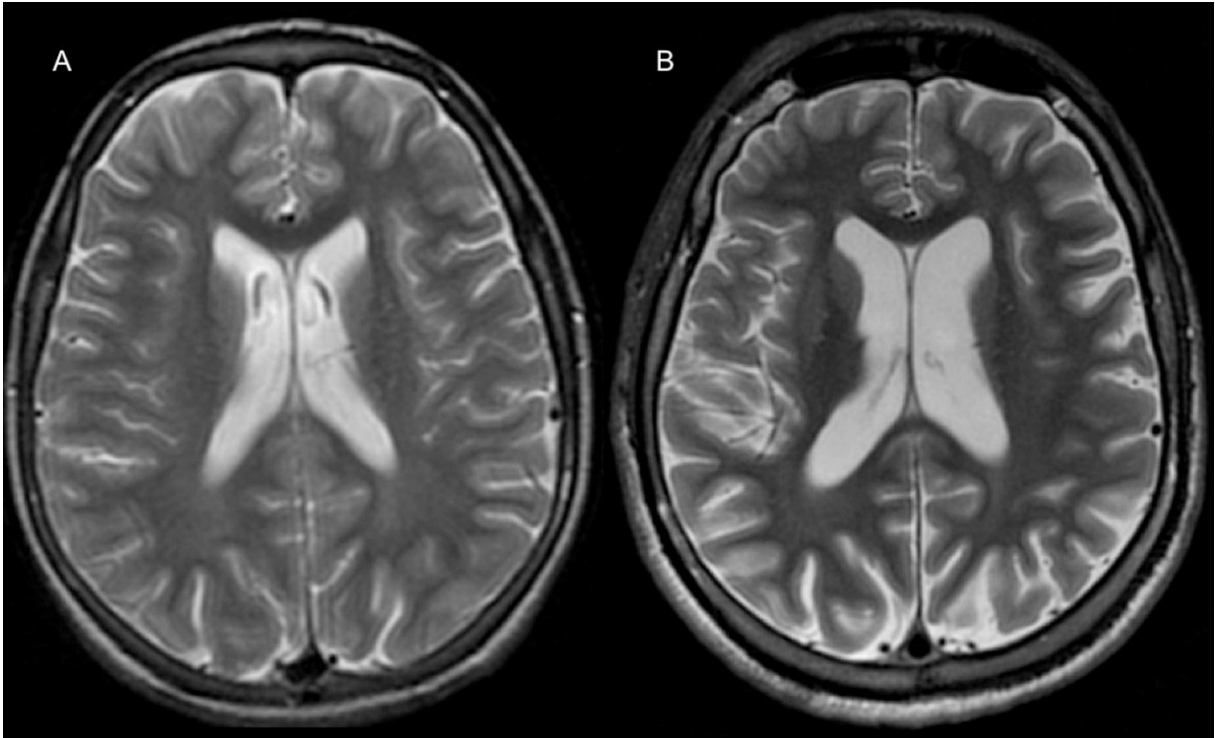
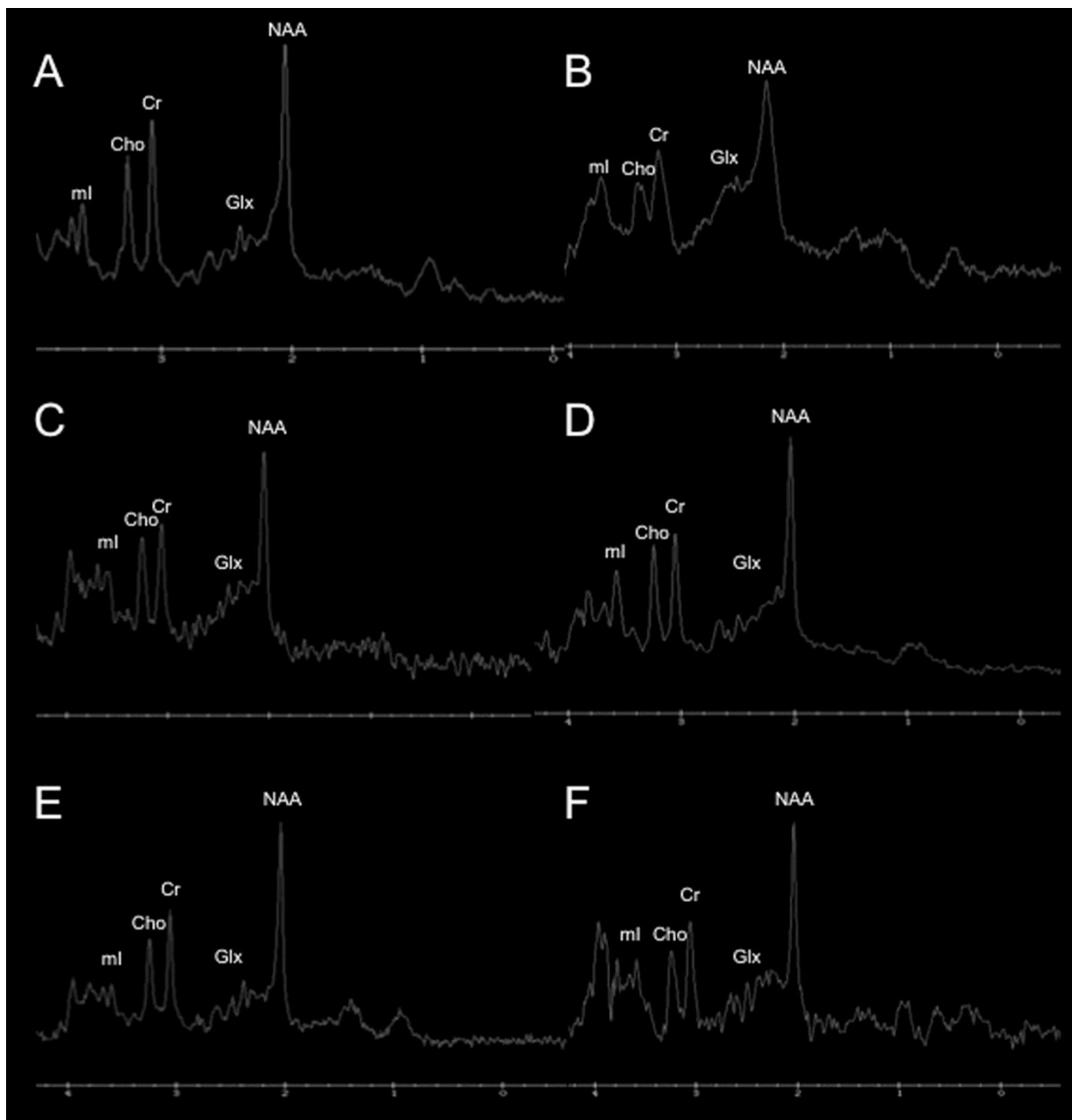


FIGURE 3. Single voxel brain ^1H -MRS spectra of the normal-appearing white matter on the right parietal lobe (short TE 31 to 35 ms) in six patients with hyperargininemia. No abnormal peaks were observed in any patient. [mI] myoinositol; [Cho] choline; [Cr] creatine; [NAA] N-acetyl-aspartate and [Glx] glutamine plus glutamate. (A) Patient 5; (B) Patient 6; (C) Patient 1; (D) Patient 7; (E) Patient 8; (F) Patient 9.



6. DISCUSSÃO

Existem poucas séries de casos de HA estudados em um único centro na literatura, ambas com um número relativamente pequeno de pacientes: cinco pacientes em Los Angeles (EUA) e sete pacientes em Toronto (Canadá) (Crombez e Cederbaum, 2005; Jain-Ghai, Nagamani *et al.*, 2011). Os trabalhos mais relevantes sobre HA com descrição de um número maior de pacientes são: um estudo multicêntrico com o resumo de 55 casos conhecidos provenientes de diferentes países em 1997 (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997); e um trabalho de outro grupo que relata dois irmãos afetados cujos dados foram avaliados comparativamente em revisão com os relatos de casos de HA descritos disponíveis na literatura da época (Prasad, Breen *et al.*, 1997). Nosso trabalho teve a oportunidade de avaliar a história clínica de um número significativo de 16 pacientes com HA sem a influência de tratamento precoce. Trata-se da primeira e única série de casos de HA na população brasileira.

Confirmamos em nossa amostra que o fenótipo mais comum da HA é de um quadro neurológico progressivo, com início na infância, e caracterizado por paraparesia espástica, epilepsia e déficit cognitivo. Deve ser enfatizada a variabilidade quanto à idade de início do quadro e também quanto à progressão das manifestações neurológicas (Scaglia e Lee, 2006; Cederbaum e Crombez, 2010). Em nossa amostra, o quadro progressivo de paraparesia espástica levou à perda da capacidade para marcha independente em quase todos os pacientes (15 dos 16 afetados). Adicionalmente, observamos em nosso estudo existir correlação entre um pior prognóstico do retardo mental e a idade mais precoce de início dos sinais de espasticidade.

Não observamos a ocorrência de crises de encefalopatia por hiperamonemia na nossa amostra de pacientes. Um quarto do pacientes desenvolveu outras manifestações neurológicas (4/16; 25%) em nosso estudo, tais como manifestações de ataxia, movimentos discinéticos e tremor involuntário de membros, de forma semelhante ao descrito na literatura (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Cederbaum e Crombez, 2010). Estes sinais provocaram uma menor repercussão na capacidade funcional se comparados às outras manifestações neurológicas da HA. Constatamos frequências semelhantes às descritas na literatura de agravos como a microcefalia (aproximadamente 40%) e o déficit de crescimento (aproximadamente 80%). Estes foram resultados baseados em medidas absolutas. Todos os pacientes com microcefalia tinham estatura abaixo do limite inferior do percentil 3, e não foi feito o ajuste de medida do perímetro cefálico para a baixa estatura.

Notamos uma frequência bem maior de manifestação de crises epiléticas quando comparada à literatura (96% versus 41%) e de sinais de autorrestricção de alimentos com grande teor de proteínas na dieta (93% versus 40%) (De Deyn, Marescau *et al.*, 1997; Prasad, Breen *et al.*, 1997). Apenas o paciente mais novo do grupo ainda não tinha manifestação de crise epilética. Em quase todos os afetados, o estudo de EEG mostrou grafoelementos epileptiformes generalizados (14/15; 93%) e apenas um único paciente com alterações focais. Além disso, foi possível constatar que o desenvolvimento de manifestações de urgência miccional foi uma complicação tardia na evolução do quadro, presente em poucos pacientes com HA (2/16; 12,5%).

As duas principais condições de diagnóstico diferencial da HA são a paraparesia espástica hereditária e a forma de diplegia espástica da paralisia cerebral (Salinas, Proukakis *et al.*, 2008; Lee, Jin *et al.*, 2011). Nesta primeira condição, também de causa genética, a paraparesia espástica hereditária, os dados clínicos mais relevantes que permitem distinguir da HA são a ausência de intolerância a alimentos ricos em proteínas e a ocorrência precoce de urgência miccional. Na segunda condição, de causa ambiental, a paralisia cerebral diplégica, os elementos que permitem a distinção da HA são a história perinatal de fatores de risco de lesão encefálica, a ausência de progressão dos sinais neurológicos e a inexistência de sinais de intolerância a alimentos ricos em proteínas.

Não foi possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo em nossa amostra, assim como já previamente sugerido na literatura (Brusilow e Horwich, 2001; Cederbaum e Crombez, 2010). Nosso estudo ampliou o conhecimento dos mecanismos genéticos da HA com a descrição de cinco novas mutações no gene *ARG1* que provocam a HA. E analisou o provável papel deletério de quatro novas mutações de troca de sentido (p.G27D; p.G74V; p.T134I; p.R308Q) na arginase I. Observamos valores maiores de atividade residual da arginase em eritrócitos dos pacientes com a mutação p.R308Q quando comparados ao restante do grupo, e esta diferença foi confirmada pelo teste de Mann-Whitney.

Embora os pacientes com a mutação p.R308Q tenham uma atividade residual de arginase em eritrócitos um pouco mais elevada, não se observou diferença significativa em relação à concentração de arginina em plasma, que se encontrava tão elevada quanto nos demais pacientes. Além disso, o quadro clínico e/ou a gravidade da progressão do fenótipo destes pacientes não foi distinto. Esse dado reforça a impressão de um provável mecanismo multifatorial da lesão cerebral que deve ocorrer na HA. Além do papel relevante do aporte da ingestão proteica nos primeiros anos de vida como fator ambiental que deve influenciar na gravidade da doença, outros fatores genéticos relacionados ao metabolismo de compostos que

derivam da arginina, como o óxido nítrico e os compostos guanidínicos, possivelmente também interferem na intensidade da lesão cerebral (Edwards, Moseley *et al.*, 2009; Deignan, De Deyn *et al.*, 2010). Adicionalmente, deve ser considerado outro fator que influenciaria a susceptibilidade ao dano neurológico como a expressão da outra forma de arginase (arginase II, ARG2). Esta enzima tem atividade catalítica muito semelhante e sabidamente pode ter a sua expressão aumentada em outros tecidos na deficiência da arginase I (Cederbaum, Yu *et al.*, 2004; Crombez e Cederbaum, 2005; Scaglia e Lee, 2006).

Apesar de não ter sido possível realizar o estudo funcional e estrutural das arginases mutantes, os efeitos deletérios sobre a função da proteína ARG1 das novas mutações de troca de aminoácidos detectadas neste estudo foram confirmados através de estudo computacional. Todas as outras mutações de substituição que causam a HA relatadas na literatura também foram submetidas a esta análise. Diferentemente das outras mutações de troca de aminoácidos, que afetam o sítio catalítico da ARG1 ou interferem na conformação da proteína, a mutação p.R308Q tem efeito na estrutura quaternária da formação do homotrímero da arginase I (Ash, Scolnick *et al.*, 1998). Acreditamos que a maior atividade residual da mutação p.R308Q se deve ao fato da mutação dificultar a associação dos monômeros da arginase I para formar o homotrímero, mas cada monômero ainda mantém uma atividade catalítica (Lavulo, Sossong *et al.*, 2001).

As mutações de troca de sentido também foram as mais frequentes nesta população brasileira (23/32; 71% dos alelos mutantes), concordante com o já relatado em outras populações (Scaglia e Lee, 2006). Apesar da relevância da ancestralidade portuguesa na composição da população brasileira pelo histórico colonial do Brasil, a mutação p.R21X foi observada somente em cinco pacientes brasileiros com HA, sendo em homozigose em apenas dois pacientes. De forma diferente ao que ocorre entre os afetados da população de Portugal, onde esta mutação é muito frequente em homozigose (Cardoso, Martins *et al.*, 1999). A mutação nova p.T134I foi a mais frequente em nossa amostragem (7/16; 43%). Esta mutação foi detectada unicamente em homozigose e os pacientes não eram procedentes da mesma região geográfica, o que pode sugerir um efeito fundador desta mutação na população brasileira.

Nosso trabalho não apontou características no estudo de neuroimagem que possam auxiliar no diagnóstico da doença ou no entendimento da neurofisiopatologia da HA. Os achados foram inespecíficos, presença de atrofia cerebral de grau variável e/ou leve atrofia cerebelar, como já apontado na literatura (Scaglia e Lee, 2006; Jain-Ghai, Nagamani *et al.*, 2011). Não foram notadas alterações de sinal de substância branca que possam indicar

processo de desmielinização ou hipomielinização nos pacientes de nossa população com o fenótipo clássico da HA com início na infância. O estudo por ressonância magnética em pacientes com suspeita de HA serve para afastar outras condições do diagnóstico diferencial, principalmente a paralisia cerebral (encefalopatia não-progressiva) secundária a eventos de isquemia cerebral perinatal.

Não detectamos picos anormais em 3,8 ppm em nossos pacientes com HA e não replicamos os achados do estudo prévio de ERM (Gungor, Akinci *et al.*, 2008). Não foi possível identificar nenhum pico anormal ou alteração na concentração de metabólitos que pudesse ser considerado patológico no estudo de ERM dos seis pacientes avaliados do nosso grupo. O papel da ERM nos casos de apresentação clássica da HA durante a infância parece indefinido, especialmente fora dos períodos de crises de encefalopatia por hiperamonemia, que são bastante incomuns.

As limitações do nosso estudo devem ser citadas. Estudamos uma amostra populacional de conveniência em uma rede de hospitais de referência para distúrbios da locomoção causados por quadros neurológicos. Dessa forma, provavelmente não tivemos acesso a pacientes afetados pela HA com o fenótipo subagudo neonatal ou com uma possível apresentação clínica diferente, sem manifestações de espasticidade.

Não foi possível realizar uma avaliação cognitiva psicométrica, o que limitou a classificação do nível de retardo mental baseada na capacidade funcional dos pacientes. De forma objetiva, o paciente foi classificado como retardo mental leve se tinha a habilidade de ler; como retardo mental moderado se era capaz de fazer narrativas e como retardo mental grave se era capaz de comer sozinho, mas não tinha linguagem verbal expressiva. Por funcionamento adaptativo entende-se o modo como a pessoa enfrenta efetivamente as exigências comuns da vida e o grau em que experimenta a independência pessoal compatível com sua faixa etária. Devemos reconhecer que a capacidade funcional do indivíduo com retardo mental pode ser influenciado por vários fatores, incluindo educação, treinamento, motivação, características de personalidade, oportunidades sociais e vocacionais, necessidades práticas e complicações médicas (Battaglia, Russo *et al.*, 2004).

Como característica do atendimento da rede SARAH de Hospitais, não houve interferência direta quanto à indicação e ao manejo da dose das drogas usadas para o controle da epilepsia. Dessa forma, não foi possível obter os dados detalhados de dose e tempo de uso dos anticonvulsivantes de cada paciente. Apenas a idade de início, a droga utilizada e o histórico de manifestações clínicas de crises convulsivas foram informações possíveis de serem adquiridas de maneira confiável em todos os pacientes.

Algumas variáveis analisadas foram sujeitas ao viés de memória dos pais, tais como a idade de início da marcha ou dos sinais de espasticidade, pois muitos pacientes foram avaliados apenas no final da infância ou na adolescência. Também houve o viés da subjetividade dos cuidadores para algumas variáveis clínicas avaliadas, como o critério de perda de vocabulário, pois não foi possível uma avaliação completa da linguagem dos pacientes.

Outra variável analisada no estudo de neuroimagem, também sujeita à subjetividade do examinador, consistiu na definição da presença de atrofia cerebral ou cerebelar. Também podemos caracterizar como uma dificuldade de nosso estudo o programa (*software*) de pós-processamento utilizado na análise de ERM, fornecido pelo fabricante do aparelho de ressonância magnética, que não permite avaliação da concentração dos metabólitos.

Em nosso estudo, todos os pacientes com o diagnóstico confirmado de HA tinham alteração na cromatografia qualitativa de aminoácidos de plasma em camada delgada com presença de banda de arginina mais intensa. Três pacientes foram excluídos como afetados do grupo de suspeita inicial e tinham cromatografia qualitativa de aminoácidos em plasma normal, mas com alteração apenas da cromatografia qualitativa de aminoácidos em urina (aminoacidúria dibásica), e apresentavam atividade normal de arginase em eritrócitos.

No intuito de avaliar o papel deste exame de triagem, a cromatografia qualitativa de aminoácidos em plasma, ainda foram estudados outros três pacientes da faixa etária pediátrica, filhos de casal consanguíneo, com o diagnóstico de paraparesia espástica hereditária. Eles tiveram dosagem de arginase também dentro dos valores da normalidade, além da cromatografia qualitativa de aminoácidos em plasma normal.

O conjunto destes dados sugere um alto valor preditivo positivo do exame alterado de cromatografia qualitativa de aminoácidos no plasma para a suspeita da HA. Contudo, deve ser lembrado que este exame sofre influência de variáveis como a experiência na interpretação das bandas e o grau de restrição de proteínas na qual o paciente pode estar submetido, principalmente pela autorrestrição proteica da dieta. O exame padrão-ouro para o diagnóstico da HA continua sendo a dosagem da atividade de arginase em hemácias.

7. CONCLUSÕES

As principais conclusões do estudo são:

(1) o fenótipo clínico da HA na amostra da população de pacientes brasileiros atendidos pela Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação é semelhante ao descrito na literatura: trata-se de uma paraparesia espástica progressiva associada a déficit cognitivo e epilepsia, com início das manifestações neurológicas e progressão que são variáveis;

(2) a manifestação epiléptica foi mais frequente do que o descrito na literatura;

(3) a ocorrência de urgência miccional é uma complicação tardia da HA e que ocorreu em poucos pacientes;

(4) cinco novas mutações no gene *ARG1* foram identificadas (p.G27D; p.G74V; p.T134I; p.R308Q e p.I174fs179) e os pacientes com a mutação p.R308Q tiveram valores de atividade enzimática residual da arginase que foram estatisticamente maiores, quando comparados ao restante do grupo, mas sem um fenótipo distinto;

(5) não foi possível estabelecer qualquer relação genótipo-fenótipo nesta série de casos de HA;

(6) a mutação nova p.T134I foi a mais frequente, sempre em homozigose, o que pode sugerir um efeito fundador na população brasileira;

(7) as anormalidades de ressonância magnética do encéfalo encontradas nesta amostra populacional foram atrofia cerebral de grau variável e/ou leve atrofia cerebelar, consideradas inespecíficas e semelhantes às descritas na literatura;

(8) a espectroscopia de prótons teve resultado considerado normal e não foi possível replicar os achados do único estudo prévio realizado sobre a HA de pico anormal em 3,8 ppm;

(9) as alterações eletroencefalográficas são muito frequentes e geralmente mostram grafoelementos epileptiformes generalizados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASH, D. E. et al. Molecular basis of hyperargininemia: structure-function consequences of mutations in human liver arginase. **Mol Genet Metab**, v. 64, n. 4, p. 243-9, Aug 1998.

BATTAGLIA, M. et al. International Classification of Functioning, Disability and Health in a cohort of children with cognitive, motor, and complex disabilities. **Dev Med Child Neurol**, v. 46, n. 2, p. 98-106, Feb 2004.

BRAGA, A. C. et al. Hyperargininemia presenting as persistent neonatal jaundice and hepatic cirrhosis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 24, n. 2, p. 218-21, Feb 1997.

BRUSILOW, S. W.; HORWICH, A. L. Urea cycle enzymes. In: SCRIVER, C. R.; SLY, W. S., et al (Ed.). **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8th. New York: McGraw-Hill, v.2, 2001. cap. 85, p.1909-1963. ISBN 978-0079130358.

CARDOSO, M. L. et al. Identification of a novel R21X mutation in the liver-type arginase gene (ARG1) in four Portuguese patients with argininemia. **Hum Mutat**, v. 14, n. 4, p. 355-6, Oct 1999.

CEDERBAUM, S.; CROMBEZ, E. A. **Arginase Deficiency**. GeneReviews. PAGON, R. A. Seattle, WA: University of Washington, Seattle 2010.

CEDERBAUM, S. D. et al. Treatment of hyperargininaemia due to arginase deficiency with a chemically defined diet. **J Inherit Metab Dis**, v. 5, n. 2, p. 95-9, 1982.

CEDERBAUM, S. D. et al. Hyperargininemia with arginase deficiency. **Pediatr Res**, v. 13, n. 7, p. 827-33, Jul 1979.

CEDERBAUM, S. D. et al. Arginases I and II: do their functions overlap? **Mol Genet Metab**, v. 81 Suppl 1, p. S38-44, Apr 2004.

CHOI, C. G.; YOO, H. W. Localized proton MR spectroscopy in infants with urea cycle defect. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 22, n. 5, p. 834-7, May 2001.

COWLEY, D. M. et al. Adult-onset arginase deficiency. **J Inherit Metab Dis**, v. 21, n. 6, p. 677-8, Aug 1998.

CROMBEZ, E. A.; CEDERBAUM, S. D. Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. **Mol Genet Metab**, v. 84, n. 3, p. 243-51, Mar 2005.

DE DEYN, P. P. et al. Hyperargininemia: a treatable inborn error of metabolism? In: DE DEYN, P. P.; MARESCAU, B., *et al* (Ed.). **Guanidino Compounds in Biology and Medicine**. London, UK: John Libbey & Company Ltd., v.2, 1997. cap. 8, p.53-69.

DEIGNAN, J. L. et al. Guanidino compound levels in blood, cerebrospinal fluid, and post-mortem brain material of patients with argininemia. **Mol Genet Metab**, v. 100 Suppl 1, p. S31-6, 2010.

DIZIKES, G. J. et al. Isolation of human liver arginase cDNA and demonstration of nonhomology between the two human arginase genes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 141, n. 1, p. 53-9, Nov 26 1986.

EDWARDS, R. L. et al. Long-term neurodevelopmental effects of early detection and treatment in a 6-year-old patient with argininaemia diagnosed by newborn screening. **J Inherit Metab Dis**, May 27 2009.

FINK, J. K. Advances in the hereditary spastic paraplegias. **Exp Neurol**, v. 184 Suppl 1, p. S106-10, Nov 2003.

GOMES MARTINS, E. et al. Neonatal cholestasis: an uncommon presentation of hyperargininemia. **J Inherit Metab Dis**, Jan 13 2011.

GRODY, W. W. et al. Differential expression of the two human arginase genes in hyperargininemia. Enzymatic, pathologic, and molecular analysis. **J Clin Invest**, v. 83, n. 2, p. 602-9, Feb 1989.

GRODY, W. W. et al. Arginase deficiency manifesting delayed clinical sequelae and induction of a kidney arginase isozyme. **Hum Genet**, v. 91, n. 1, p. 1-5, Mar 1993.

GRODY, W. W. et al. Molecular genetic study of human arginase deficiency. **Am J Hum Genet**, v. 50, n. 6, p. 1281-90, Jun 1992.

GUNGOR, S. et al. Neuroimaging findings in hyperargininemia. **J Neuroimaging**, v. 18, n. 4, p. 457-62, Oct 2008.

HARRINGTON, J. W.; STIEFEL, M.; GIANOS, E. Arginase deficiency presenting with cerebral oedema and failure to thrive. **J Inherit Metab Dis**, v. 23, n. 5, p. 517-8, Jul 2000.

HERTECANT, J. L. et al. A novel mutation in ARG1 gene is responsible for arginase deficiency in an Asian family. **Saudi Med J**, v. 30, n. 12, p. 1601-3, Dec 2009.

HEWSON, S.; CLARKE, J. T.; CEDERBAUM, S. Prenatal diagnosis for arginase deficiency: a case study. **J Inherit Metab Dis**, v. 26, n. 6, p. 607-10, 2003.

IYER, R. et al. The human arginases and arginase deficiency. **J Inherit Metab Dis**, v. 21 Suppl 1, p. 86-100, 1998.

IYER, R. K. et al. Mouse model for human arginase deficiency. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 13, p. 4491-8, Jul 2002.

JAIN-GHAI, S. et al. Arginase I deficiency: Severe infantile presentation with hyperammonemia: More common than reported? **Mol Genet Metab**, v. 104, n. 1-2, p. 107-11, Jul 13 2011.

KORMAN, S. H. et al. Prenatal diagnosis for arginase deficiency by second-trimester fetal erythrocyte arginase assay and first-trimester ARG1 mutation analysis. **Prenat Diagn**, v. 24, n. 11, p. 857-60, Nov 2004.

LAMBERT, M. A. et al. Hyperargininemia: intellectual and motor improvement related to changes in biochemical data. **J Pediatr**, v. 118, n. 3, p. 420-4, Mar 1991.

LANDSVERK, M. L. et al. Utilization of targeted array comparative genomic hybridization, MitoMet, in prenatal diagnosis of metabolic disorders. **Mol Genet Metab**, v. 103, n. 2, p. 148-52, Jun 2011.

LAVULO, L. T. et al. Subunit-subunit interactions in trimeric arginase. Generation of active monomers by mutation of a single amino acid. **J Biol Chem**, v. 276, n. 17, p. 14242-8, Apr 27 2001.

LEE, B. H. et al. Argininemia presenting with progressive spastic diplegia. **Pediatr Neurol**, v. 44, n. 3, p. 218-20, Mar 2011.

MARESCAU, B. et al. Guanidino compound analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia: follow-up of guanidino compound levels during therapy. **Pediatr Res**, v. 27, n. 3, p. 297-303, Mar 1990.

NAGATA, N.; MATSUDA, I.; OYANAGI, K. Estimated frequency of urea cycle enzymopathies in Japan. **Am J Med Genet**, v. 39, n. 2, p. 228-9, May 1 1991.

OLDHAM, M. S. et al. Diffusion tensor imaging in arginase deficiency reveals damage to corticospinal tracts. **Pediatr Neurol**, v. 42, n. 1, p. 49-52, Jan 2010.

PERALTA SERRANO, A. [Argininuria, convulsions and oligophrenia; a new inborn error of metabolism?]. **Rev Clin Esp**, v. 97, n. 3, p. 176-84, May 15 1965.

PICKER, J. D. et al. Arginase deficiency with lethal neonatal expression: evidence for the glutamine hypothesis of cerebral edema. **J Pediatr**, v. 142, n. 3, p. 349-52, Mar 2003.

PRASAD, A. N. et al. Argininemia: a treatable genetic cause of progressive spastic diplegia simulating cerebral palsy: case reports and literature review. **J Child Neurol**, v. 12, n. 5, p. 301-9, Aug 1997.

QURESHI, I. A. et al. Treatment of hyperargininemia with sodium benzoate and arginine-restricted diet. **J Pediatr**, v. 104, n. 3, p. 473-6, Mar 1984.

SALINAS, S. et al. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 12, p. 1127-38, Dec 2008.

SCAGLIA, F.; LEE, B. Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, v. 142C, n. 2, p. 113-20, May 15 2006.

SCHEUERLE, A. E. et al. Arginase deficiency presenting as cerebral palsy. **Pediatrics**, v. 91, n. 5, p. 995-6, May 1993.

SHI, O. et al. Generation of a mouse model for arginase II deficiency by targeted disruption of the arginase II gene. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 3, p. 811-3, Feb 2001.

SIMONI, R. E. et al. Hyperargininaemia: a late-diagnosed Brazilian case with increased urinary excretion of homocystine. **J Inherit Metab Dis**, v. 20, n. 5, p. 715-6, Sep 1997.

SNYDERMAN, S. E. et al. Argininemia treated from birth. **J Pediatr**, v. 95, n. 1, p. 61-3, Jul 1979.

SPECTOR, E. B.; RICE, S. C.; CEDERBAUM, S. D. Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase-deficient patients. **Pediatr Res**, v. 17, n. 12, p. 941-4, Dec 1983.

TERHEGGEN, H. G. et al. [Hyperargininemia with arginase deficiency. A new familial metabolic disease. II. Biochemical studies]. **Z Kinderheilkd**, v. 107, n. 4, p. 313-23, 1970.

UCHINO, T. et al. Three novel mutations in the liver-type arginase gene in three unrelated Japanese patients with argininemia. **Am J Hum Genet**, v. 51, n. 6, p. 1406-12, Dec 1992.

UCHINO, T. et al. Molecular basis of phenotypic variation in patients with argininemia. **Hum Genet**, v. 96, n. 3, p. 255-60, Sep 1995.

VOCKLEY, J. G. et al. Loss of function mutations in conserved regions of the human arginase I gene. **Biochem Mol Med**, v. 59, n. 1, p. 44-51, Oct 1996.

VOCKLEY, J. G. et al. Cloning and characterization of the human type II arginase gene. **Genomics**, v. 38, n. 2, p. 118-23, Dec 1 1996.

VOCKLEY, J. G. et al. Identification of mutations (D128G, H141L) in the liver arginase gene of patients with hyperargininemia. **Hum Mutat**, v. 4, n. 2, p. 150-4, 1994.

ANEXO 1

Comitê de Ética em Pesquisa da Associação das Pioneiras Sociais

CERTIDÃO

Declaramos que o trabalho intitulado *Avaliação de Pacientes Brasileiros com Hiperargininemia*, de Daniel Rocha de Carvalho, Médico, foi apreciado e considerado correto sob o ponto de vista ético pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação, em oito de fevereiro de 2010.

Brasília-DF, 19 de fevereiro de 2010.

Dr. Renato Ângelo Saraiva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Associação das Pioneiras Sociais

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nós estamos convidando vocês a participarem do projeto de pesquisa da Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação denominado 'AVALIAÇÃO DE PACIENTES BRASILEIROS COM HIPERARGININEMIA' com o objetivo de conhecer melhor esta afecção genética e gostaríamos que soubessem que:

- participar deste projeto é uma opção e podem decidir participar deste projeto ou não;
- e principalmente, caso vocês decidirem não participar ou desistirem de participar a qualquer momento **NÃO HAVERÁ PREJUÍZO** de qualquer tratamento ou benefício que estiverem tendo neste Hospital.

Caso vocês decidam participar deste projeto, gostaríamos de garantir a privacidade dos dados colhidos e de informar-lhes que:

- a) Serão obtidas informações médicas do paciente através do prontuário desta instituição;
- b) Serão coletados 12 ml (2 colheres de sopa) de sangue do paciente;
- c) A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico pela picada da agulha e existe uma chance de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta;
- d) Serão realizados dois exames com o material coletado para confirmar a hiperargininemia: dosagem da concentração dos aminoácidos no sangue (aumento do nível da arginina) e a dosagem da atividade da arginase (muito baixa nos pacientes);
- e) Será realizado um exame com o material genético (DNA) extraído a partir do sangue coletado para observar se existe a presença de uma mutação genética no gene denominado *ARG1* que ocorre usualmente apenas nos pacientes com a hiperargininemia;
- f) Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para o paciente ou sua família e podem demorar meses e até anos para que fiquem prontos;
- g) Assim que os resultados estiverem prontos eles serão apresentados a vocês pelo pesquisador responsável em nova consulta, caso desejem tomar conhecimento, para acompanhamento e aconselhamento genético;
- h) Os resultados deverão ser publicados em revista científica que circula apenas entre os profissionais da saúde que se interessam por este assunto, mas seus nomes nunca aparecerão nas publicações científicas dos resultados, porque sempre que fazemos pesquisas a identidade do paciente é mantida em absoluto sigilo;
- i) O resultado do exame estará disponível exclusivamente no prontuário do paciente do Hospital SARAH. Se for desejo do paciente, também será enviado o resultado destes exames para os médicos e profissionais de saúde que cuidam do paciente;
- j) Não será realizado nenhum outro exame com o material genético (DNA) ou qualquer outro exame com parte do sangue coletado.

Eu, _____, portador do RG número _____, declaro para os devidos fins que concordo em participar da pesquisa 'AVALIAÇÃO DE PACIENTES BRASILEIROS COM HIPERARGININEMIA' a ser realizada pelo Hospital SARAH de Reabilitação.

Declaro ainda que recebi todos os esclarecimentos e explicações sobre a referida pesquisa e que minha desistência poderá ocorrer em qualquer momento sem que haja qualquer prejuízo do atendimento que estou recebendo ou venha a necessitar. De minha livre e espontânea vontade, assino esta autorização.

Assinatura do paciente ou responsável

Daniel Rocha de Carvalho
Pesquisador responsável

_____, ____/____/____

Nome completo (do responsável): _____

Nome do Paciente: _____

Endereço de contato- (1) Responsável pela pesquisa: Daniel Rocha de Carvalho; (2) Orientador: Carlos Eduardo Speck Martins. Laboratório de Genética, Hospital SARAH-Brasília, SMHS Quadra 501 Conj. A, Brasília-DF, 70.330-150. Telefone de contato: (61) 3319-1030. E-mail: danielcarvalho@sarah.br.

ANEXO 3**FICHA DE PREENCHIMENTO DA PESQUISA 'AVALIAÇÃO DE PACIENTES
BRASILEIROS COM HIPERARGININEMIA'****Obs: As informações mais relevantes para esta pesquisa estão em negrito**

PACIENTE: _____

RESPONSÁVEL: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____ IDADE NA AVALIAÇÃO: _____

Registro: _____ TELEFONE DE CONTATO: _____

DATA DA AVALIAÇÃO CLÍNICA: ____ / ____ / ____

DADOS PERINATAIS:

1) Fatores de risco como sangramento vaginal, manobra abortiva, internamento, uso de teratogênicos, suspeita de diabetes ou outra doença materna: _____

2) Idade gestacional ____ semanas Tipo de parto: vaginal [] cesariano [] Fórceps []
Descrever intercorrências: _____

3) Apgar: _____ ; Peso: _____ g ; Comprimento: _____ cm ; PC: _____ cm

4) Alta da maternidade: _____ dias

5) Vômitos no período neonatal: [] não [] sim _____ dias

6) Alteração no exame neurológico ou convulsão no período neonatal:

HISTÓRIA FAMILIAR:

Consanguinidade: Não [] Sim []

Descrever grau de parentesco: _____

Irmãos afetados ou com suspeita diagnóstica: _____

ALIMENTAÇÃO NO 1º e 2º ANO DE VIDA:

Aleitamento materno exclusivo até _____ meses.

Introdução de leite de vaca e derivados: _____ meses; carnes: _____ meses

Recorrência de vômitos após as refeições: Não [] Sim []

Internamento por alteração de consciência, vômitos ou convulsão até o 2º ano de vida: _____

INÍCIO DOS SINAIS:

Primeiro sinal de anormalidade percebido pela família (idade _____ meses):

MARCOS DO DESENVOLVIMENTO: Sentou sem apoio com _____ meses

Engatinhou: Não [] Sim [] _____ meses

Andou: Não [] Sim [] _____ meses

O aspecto da marcha já era alterado: Não [] Sim [] descrever: _____

Falou palavras: _____ meses Formou frases: _____ meses
 Controle de esfíncter vesical: diurno _____ meses noturno: _____ meses

AGRAVOS NEUROLÓGICOS ASSOCIADOS:

1) Convulsões: Não [] Sim [] primeira manifestação com _____ meses

Descrever aspecto das primeiras crises: _____

Resultado disponível de EEG (Data ___/___/___): _____

Anticonvulsivante em uso (descrever dose): _____

Idade da última crise convulsiva: _____

Aspecto da última crise: _____

2) Sinais cerebelares? Não [] Sim [] Qual idade? _____

Descrever _____

3) Sinais extrapiramidais? Não [] Sim [] Qual idade? _____

Descrever _____

4) Idade de diagnóstico da espasticidade? _____

Diplegia espástica de membros inferiores [] ou Quadriplegia espástica []

Necessita de auxílio locomoção? Não [] Sim [] Qual idade? _____

Cadeira de rodas [] Andador [] Bengala []

5) O paciente tem controle pleno de esfíncter? Sim []

Incontinência urinária [] ou fecal []? Urgência urinária [] ou fecal []?

Descrever: _____

OUTROS AGRAVOS ASSOCIADOS:

1) Histórico de vômitos, náusea e irritabilidade intermitentes? Não [] Sim []

Qual idade? _____

2) Necessidade de internação por vômitos e/ou alteração do nível de consciência?

Não [] Sim [] Descrever idade e resultado de exames: _____

3) Paciente faz seleção na sua alimentação? Não [] Sim []

Descrever: _____

4) Tem intolerância à carne ou a certos tipos de alimentos? Não [] Sim []

Descrever: _____

DADOS DE EVOLUÇÃO DA DOENÇA:

Idade de diagnóstico da hiperargininemia: _____

Idade de início de tratamento dietético: _____

Faz uso de fenilbutirato ou benzoato de sódio? _____

Houve piora da espasticidade ao longo do curso da doença? Não [] Sim []

A partir de qual idade? _____

Descrever: _____

Houve perda de aquisições ao longo do curso da doença? Não [] Sim []

A partir de qual idade? _____

Descrever: _____

Evoluiu com déficit de crescimento? Não [] Sim []

Registrar estatura/comprimento em todas as idades disponíveis: _____

Evoluiu com diminuição do perímetro cefálico (PC)? Não [] Sim []

Registrar PC em todas as idades disponíveis: _____

DADOS DA CAPACIDADE FUNCIONAL:

Obs: descrever Sim (S) Não (N) e comentários

consegue comer sem auxílio de terceiros: _____

consegue despir-se: _____

consegue vestir-se: _____

capaz de calçar sapatos sozinho: _____

tem marcha independente sem auxílio: _____ Qual distância? _____

fala palavras inteligíveis: _____

capaz de formar pequenas frases isoladas: _____

forma frases com conteúdo e contexto adequado: _____

capaz de fazer relatos: _____

sabe partes do corpo: _____

sabe diferenciar cores: _____

tem noção de dias da semana e do mês: _____

sabe contar e tem noção de quantidade: _____

sabe reconhecer o próprio nome escrito: _____

consegue ler algumas palavras isoladas: _____

tem capacidade de leitura independente: _____

capacidade para escrever sem auxílio: _____

OUTROS ANTECEDENTES PATOLÓGICOS:

Tratamento de outra doença: _____

Medicamento já utilizado previamente: _____

Cirurgia: _____

OUTROS DADOS:

Estatura: _____ cm (P _____); Peso: _____ kg (P _____); PC: _____ cm (P _____)

Desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários: _____

Descrever presença de restrição articular: _____

1. Tornozelos: _____
2. Joelhos: _____
3. Quadris: _____
4. Outras articulações: _____

Clônus: _____

Hiperreflexia: _____

Reflexo cutâneo-plantar: _____

Cruzamento de membros inferiores: _____

Outros agravos, sinais clínicos e anormalidades ao exame físico: _____

AVALIAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA:

EXAMES BIOQUÍMICOS COMPLEMENTARES:

HEREDOGRAMA: