

## Alkaptonúria – Velha Doença, Nova Mutação

AGUINALDO CABRAL \*, ISABEL T. ALMEIDA \*\*, TERESA TASSO \*, FILOMENA EUSÉBIO \*, ANA GASPAR \*

\* *Unidade de Doenças Metabólicas. Serviço de Pediatria. Hospital de Santa Maria. Lisboa.*

\*\* *Centro de Patogénese Molecular. Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa.*

### Resumo

São apresentados 3 doentes com alkaptonúria (AKU) com idade actual de 6,5 anos (sexo masculino), e 9 anos e 11 anos (sexo feminino, irmãs).

Todos os doentes apresentaram, desde o nascimento, urina que se tornava escura após o contacto com o ar.

O diagnóstico definitivo foi tardio, ocorrendo aos 23 meses no rapaz e 5 anos e 7 anos nas irmãs.

Todos iniciaram tratamento com ácido ascórbico (1g/dia), que perdura há 55 meses no rapaz e 49 e 60 meses nas raparigas; há 12 meses iniciaram restrição proteica (máximo: 1,5g/kg/dia) associada à vitamínoterapia. Os resultados da terapêutica foram significativos: redução da excreção de HGA, e urinas mais claras. Nunca apresentaram qualquer outro sinal ou sintoma específico, ou alterações radiológicas sugestivas de AKU.

A análise mutacional revelou serem os doentes homocigotos para a mutação M368V, o rapaz, e para a mutação T196 fs, as duas irmãs; esta última mutação era desconhecida, e terá possível origem portuguesa.

A AKU não é uma doença benigna. As graves alterações degenerativas osteoarticulares, invalidantes, e as manifestações sistémicas poderão ser evitadas ou atrasadas o seu surgimento com o diagnóstico e terapêutica precoces. O fenómeno das «urinas escuras» deve ser valorizado pelos pediatras como sinal de reconhecimento da doença.

**Palavras-Chave:** Urinas escuras, ocronose, artrite, ácido ascórbico, restrição proteica, mutações.

### Summary

#### Alkaptonuria – Old Disease, New Mutation

The Authors present 3 patients with Alkaptonuria (AKU), at present aged 6.5 years (male) and 9 and 11 years (2 female sisters).

All patients presented, from birth, urine which darkened with exposure to air.

*Correspondência:* Aguinaldo Cabral  
Unidade de Doenças Metabólicas  
Serviço de Pediatria. Piso 6  
Hospital de Santa Maria. Lisboa

Aceite para publicação em 06/03/2001.  
Entregue para publicação em 03/01/2001.

Definite diagnosis was late, occurring at 23 months in the male patient and at 5 and 7 years in the two sisters.

All of them started treatment with ascorbic acid (1g/day), and this treatment has been going on for 55 months in the boy and 49 and 60 months respectively in the girls; 12 months ago, they started protein restriction (maximum: 1.5g/kg/day) associated to vitamin therapy. Results of treatment were significant: reduction of HGA excretion and clearer urine.

They never presented other specific signs or symptoms or radiological changes suggesting AKU.

Mutational analysis revealed that patients were homozygous for the M368V mutation in the boy and for the T196 fs mutation in the girls; this later mutation was unknown up to now and appears to be portuguese in origin.

AKU is not a benign condition. The severe and crippling bone and joint degenerative changes, as well as systemic manifestations, may be prevented or delayed thanks to early diagnosis and treatment. The occurrence of «dark urine» must be valued by paediatricians as a sign of the disease.

**Key-Words:** Dark urine, ochronosis, arthritis, ascorbic acid, protein restriction, mutation

### Introdução

A Alkaptonúria (AKU, McKusick 203500) é uma doença autossómica recessiva do catabolismo da fenilalanina/tirosina, devida à deficiência da enzima oxidase do ácido homogentísico (HGO, EC 1.13.11.5) <sup>(1)</sup>. Caracteriza-se clinicamente por uma tríade sintomática: urinas escuras, ocronose (pigmentação do tecido conjuntivo) e artrite <sup>(1,2)</sup>. A deficiência enzimática leva à acumulação do ácido homogentísico (HGA) no sangue e sua eliminação pela urina. Com pH alcalino e a presença de oxigénio o HGA oxida-se em ácido benzoquinonacético e polimeriza-se dando origem ao pigmento negro (alkapton), que dá à urina a cor característica <sup>(1,2)</sup>. O processo de oxidação e polimerização ocorre também no organismo, ainda que de modo mais lento, depositando-se o pigmento nos tecidos conjuntivos dos doentes. Esta deposição lentamente progressiva é lesiva do tecido conjuntivo, levando à degenerescência das cartilagens e grandes articulações, pro-

vocando uma artropatia degenerativa, dolorosa e invalidante<sup>(1-3)</sup>.

Trata-se de uma velha doença conhecida pelo menos desde o século XVI, rara, mas de inegável interesse histórico, científico e clínico<sup>(1, 3, 4)</sup>. Foi a primeira doença humana interpretada como defeito hereditário autossômico recessivo; o seu estudo permitiu a introdução do importante conceito de «erro inato do metabolismo», e das noções de «defeito enzimático» e «bloqueio metabólico» por Garrod em 1902-1908<sup>(3, 4)</sup>. O defeito enzimático foi demonstrado por La Du em 1958<sup>(5)</sup>; a clonagem do gene da HGO foi realizada por Fernandez-Cañón em 1996<sup>(6, 7)</sup>. O gene humano da HGO é um gene de cópia única localizado no cromossoma 3 (3q21-q23)<sup>(6-8)</sup>. Em 1999 eram conhecidas 29 mutações e diferentes polimorfismos, e pouco mais de um milhar de casos estavam descritos<sup>(1, 9)</sup>.

Devido às graves consequências a nível osteoarticular e sistémico, importa diagnosticar a doença precocemente afim de que o tratamento dietético e medicamentoso possa evitar ou atrasar o processo degenerativo incapacitante. Neste sentido, apresenta-se a experiência da Unidade de Doenças Metabólicas do Serviço de Pediatria do Hospital de Santa Maria sobre o diagnóstico, tratamento e evolução de três casos pediátricos.

### Doentes

São apresentados três doentes com AKU, um do sexo masculino, actualmente com 6,5 anos, e dois do sexo feminino, irmãs, de 9 anos e 11 anos de idade.

Não se registou em qualquer dos casos consanguinidade dos pais. Todos nasceram após gravidez de termo, um de forceps, as duas irmãs de cesariana. Na história familiar há a referir «doença reumática» na avó materna do rapaz, «urinas escuras» e «graves problemas ósseos» em dois tios maternos das irmãs.

Desde o nascimento foi notado, em todos os pacientes, que a urina, uma vez exposta ao ar, ficava escura, acastanhada, manchando as fraldas.

Nenhum dos doentes apresentou, até à idade do diagnóstico, qualquer outro sintoma específico da doença, nomeadamente ao nível da pele e mucosas, olhos, cartilagens, articulações ou coração; o suor e o cerúmen não tinham coloração anormal. O rapaz tinha uma discreta escoliose dorsal sinistro-convexa, e um supra-desnívelamento da crista ilíaca direita de 3 mm.

As crianças nunca foram medicadas com atabrine ou altas doses de salicilatos, ou usaram pensos com ácido carbólico, ou cremes e loções com hidroquinonas.

O diagnóstico definitivo ocorreu aos 23 meses no rapaz, e aos 5 anos e 7 anos nas irmãs.

Logo após o diagnóstico todos foram medicados com ácido ascórbico e, em 1999, iniciaram restrição proteica associada à vitaminoterapia.

### Métodos

O diagnóstico de AKU foi feito por cromatografia de ácidos orgânicos, plasmáticos e urinários, por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS), que mostrou uma elevada excreção de HGA na urina; a cromatografia de aminoácidos no plasma e urina, normal em todos os pacientes, foi realizada por HPLC (high performance liquid chromatography).

O estudo mutacional foi executado por Santiago Rodríguez de Córdoba – Departamento de Imunologia. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) y Unidad de Patología Molecular. Fundación Jimenez Diaz (Madrid) – em sangue colhido em tubos com EDTA (3 cc), após consentimento informado dos progenitores. O tratamento consistiu na administração de ácido ascórbico (1 g/dia), a que se juntou em 1999, dieta com restrição de proteínas naturais até o máximo de 1,5 g/kg/dia.

A evolução dos doentes foi acompanhada por observação clínica regular, doseamentos seriados de HGA na urina, e vigilância radiológica periódica das grandes articulações e coluna vertebral.

### Resultados

O diagnóstico definitivo foi feito aos 23 meses no rapaz e aos 5 anos e 7 anos nas duas irmãs.

O tratamento vitamínico, e mais ainda a vitaminoterapia associada à restrição proteica, fez diminuir a acidúria homogentísica de forma significativa: o fenómeno das «urinas escuras» tornou-se menos evidente a intermitente.

O tratamento medicamentoso foi iniciado há respectivamente 55 meses no rapaz e 49 e 60 meses nos doentes do sexo feminino; o tratamento dietético foi introduzido há aproximadamente 12 meses.

Excluindo a acidúria homogentísica, agora inconstante, os doentes não apresentaram qualquer sintomatologia clínica referente à ocronose, à artrite, ou qualquer outra manifestação sistémica da doença.

O controlo radiológico, particularmente ao nível das grandes articulações e corpos vertebrais, não mostrou alterações específicas. A doente mais velha, de 11 anos, desenvolveu após o diagnóstico uma pequena saliência óssea na face interna do joelho direito, não acompanhada de dor ou limitação da locomoção. A análise mutacional revelou que o rapaz é homozigoto para a mutação M368V

(c.1269 A → G); as duas irmãs são homozigotas para a muta o T196fs (c.754 del c), desconhecida até ao momento.

O desenvolvimento psicomotor e estaturoponderal   normal em todos os pacientes.

### Discussão

Os doentes estudados apresentaram, desde o nascimento, urina que se tornava escura após exposi o ao ar, manchando as fraldas. A urina quando   emitida tem cor normal, escurecendo depois de um período mais ou menos longo de contacto com o ar <sup>(1-3)</sup>. Na presença de pH alcalino e de oxig nio o HGA oxida-se e polimeriza dando origem ao pigmento negro, que escurece a urina.   um sinal precoce de reconhecimento da doença: pode detectar-se após as 38 horas de vida, no período de lactente ou levar anos a evidenciar-se <sup>(1,2)</sup>. Juntando um alcali   urina o escurecimento   mais rápido, como acontece com as fraldas de pano molhadas com urina de doente quando lavadas com sabão ou detergente alcalino: ficam pretas ou castanhas <sup>(1,2)</sup>. As actuais fraldas descartáveis ganham uma colora o mais avermelhada <sup>(2)</sup>. Se o pH urinário for ácido o escurecimento pode levar horas a estabelecer-se ou passar despercebido <sup>(2)</sup>.

Nos indivíduos saudáveis o HGA não   detectado no sangue e urina; um adulto doente excreta 4-8 g ou mais de HGA por dia, dependendo do aporte proteico <sup>(1-3,5)</sup>. Altas doses de salicilatos podem provocar o aparecimento de pequenas quantidades de HGA no sangue e urina <sup>(1)</sup>, facto que não ocorreu nos nossos doentes.

O diagnóstico definitivo dos pacientes apresentados foi muito tardio, demorando em m dia mais de 55 meses, o que evidencia um grande desconhecimento acerca desta patologia. A tri de sintomática da AKU, seja a acidúria homogentísica, a ocronose e a artrite raramente se manifesta de modo completo nas crianças e jovens; os doentes são assintomáticos nas primeiras duas décadas de vida <sup>(1,2)</sup>.

Assim, o fen meno isolado das «urinas escuras»   de grande valor diagnóstico, particularmente na idade pediátrica.

A ocronose consiste na deposi o difusa de pigmento nos tecidos conjuntivos, processo que   lento, porquanto a excre o renal do HGA   muito eficaz, reduzindo a acumula o pigmentar <sup>(1-3,5)</sup>.

O primeiro sinal exterior de ocronose  , geralmente, a pigmenta o das escleróticas e pavilhões auriculares, que podendo surgir incidiosamente após os 7-8 anos de idade,   rara antes dos 20-30 anos <sup>(1,2,10)</sup>. A pigmenta o ocorre no local de inser o dos músculos rectos, na conjuntiva e c rnea; os pavilhões auriculares ficam espessados e com colora o azulada ou acizentada. A pigmenta o pode

ainda ser visível nas bochechas, testa, mãos, axilas, orgãos genitais e mucosa bucal. A ocronose atinge também as cartilagens costal, laríngea e traqueal, os tecidos fibrosos, tendões e ligamentos, o endocárdio e íntima; o suor e o cerúmen podem adquirir uma cor castanha a negra. A pigmenta o ocron tica não deve ser confundida com a resultante do uso prolongado de atabrine, de pensos com ácido carbólico, de cremes ou lo es para branquear a pele contendo hidroquinonas, ou nos tumores melan ticos <sup>(1,2)</sup>.

A artrite   mais precoce e grave nos doentes do sexo masculino, assemelhando-se   artrite reumatóide <sup>(1,2)</sup>. Os primeiros sintomas são a limita o da mobilidade das grandes articula es, anca e joelhos e coluna, por vezes com períodos agudos de inflama o. Mais tarde estabelece-se uma grave limita o da locomo o, anquilose lombo-sagrada, artropatia dolorosa e invalidez <sup>(1-3,7)</sup>.

As altera es radiológicas são particularmente significativas ao nível dos corpos vertebrais (especialmente lombares), e nas grandes articula es <sup>(1-3)</sup>. Nos corpos vertebrais há degenerescência dos discos intervertebrais, estreitamento dos espaços, calcifica o densa dos discos, fusão dos corpos vertebrais (aspecto bamboo-like), forma o rara de osteofitos e calcifica o mínima dos ligamentos intervertebrais <sup>(1,2)</sup>. Nas grandes articula es podem observar-se altera es osteoart ricas degenerativas e depósitos calcificados nos tendões musculares <sup>(1,2)</sup>. Nas pequenas articula es as anomalias são mínimas a ausentes. A calcifica o da cartilagem dos pavilhões auriculares, visível radiologicamente, tem interesse diagnóstico <sup>(1,2)</sup>.

Os nossos doentes, actualmente com 6,5, 9 e 11 anos de idade, não apresentaram qualquer sintomatologia de artrite nem altera es radiológicas sugestivas de AKU; a discreta escoliose e desnivelamento da crista ilíaca direita no rapaz, e o aparecimento de pequena saliência óssea na face interna do joelho direito da rapariga mais velha não têm, aparentemente, liga o com a doença de base.

A causa de degenerescência das cartilagens e dos discos intervertebrais, ainda não totalmente conhecida, parece ser plurifactorial. O pigmento actuando como irritante químico acelera o processo degenerativo; o pigmento e o HGA inibem os sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo da cartilagem, como a lisil-hidroxilase; o HGA tem efeito citotóxico sobre os condrocitos articulares <sup>(1,2,6)</sup>. Os doentes podem apresentar alta incidência de patologia cardiovascular, como valvulite mitral e aórtica, aneurisma da aorta e ventrículo esquerdo, aterosclerose generalizada, calcifica o das valvas cardíacas; o enfarte agudo do miocárdio pode ser uma causa comum de morte <sup>(1,2)</sup>. Outras complica es estão descritas como a ruptura dos discos intervertebrais, prostatite e cálculos renais <sup>(1,6)</sup>.

Muitos foram os tratamentos ensaiados nesta doença: vitaminas várias, insulina, corticóides, fenilbutazona...

todos sem qualquer efeito<sup>(1,2)</sup>. Apenas o ácido ascórbico, usado desde 1940<sup>(2)</sup>, diminui a formação do pigmento ocrónico ao reduzir o nível do ácido benzoquinonacético, limitar a acção citotóxica do HGA sobre os condrocitos articulares, e activar a HGO e a lisil-hidroxilase<sup>(1,2,6)</sup>. A administração diária de ácido ascórbico foi o tratamento inicial nos nossos doentes, com resultados significativos: redução da excreção urinária do HGA, e a urina tornou-se mais clara. Vários regimes dietéticos de baixo conteúdo proteico foram propostos<sup>(10)</sup>. O aporte de 1 g/kg/dia de proteínas naturais produz importante redução da excreção do HGA<sup>(10)</sup>. A restrição proteica (1,1 a 1,5 g/kg) parece ser actualmente a forma mais lógica de tratamento<sup>(1,10)</sup>. Os nossos doentes iniciaram em 1999 a terapêutica dietética, estando a criança mais jovem de 6,5 anos com um aporte máximo de 1,5 g/kg/dia de proteínas.

Como a formação do pigmento é paralela ao ritmo de produção de HGA, é de prever que o início precoce da restrição proteica leve a um grau muito menor de deposição pigmentar, quando os doentes atingirem a idade adulta. Como os sinais de artrite parecem estar directamente relacionados com a quantidade de pigmento depositado nas articulações, ao longo dos anos, é convicção actual que a restrição proteica possa atrasar o surgimento das alterações artríticas pelo menos em uma a duas décadas<sup>(10)</sup>.

A análise mutacional revelou serem os doentes apresentados homocigotos para a mutação M368V (c.1269 A → G), o rapaz, e para a mutação T196fs (c. 754 del c), as duas irmãs. Em 1999 eram conhecidas 29 mutações e diferentes polimorfismos<sup>(8,9)</sup>. A AKU apresenta uma notável heterogeneidade alélica<sup>(8,9)</sup>. O número de casamentos consanguíneos costuma ser muito elevado<sup>(1)</sup>, facto que não ocorreu nos pacientes estudados. Apenas três mutações: M368V, P230S e V300G foram encontradas em mais do que um doente<sup>(3,8,9)</sup>. Estas mutações mais prevalentes são muito antigas possivelmente introduzidas na Europa com as primeiras migrações humanas<sup>(3,8,9)</sup>. A mutação M368V, associada ao haplotipo HGO-A, é característica das populações europeias, especialmente do norte do continente<sup>(3)</sup>; a P230S, associada ao haplotipo HGO-E, é frequente nos povos mediterrânicos, particularmente nos espanhóis<sup>(3,7,8)</sup>; a V300G, de origem mais recente, foi encontrada em mais do que uma região geográfica<sup>(8)</sup>.

A mutação descrita nas duas irmãs era desconhecida, colocando-se a hipótese de ter origem portuguesa.

Os efeitos das mutações sobre a função da proteína HGO são, em grande parte, desconhecidos<sup>(8)</sup>. Os estudos populacionais e de epidemiologia genética têm tido gran-

des progressos nas últimas décadas<sup>(3,4,9)</sup>, podendo contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos que desencadeiam a artropatia, e para o surgimento de novas terapêuticas mais eficazes<sup>(5,7)</sup>. A terapia génica somática pode ser possível a médio prazo<sup>(3,5)</sup>.

Em conclusão: a AKU é uma doença rara, com uma incidência de 1/250.000 na população em geral<sup>(3)</sup>, mas não é uma doença benigna, como se pensava antigamente<sup>(1,2)</sup>. O diagnóstico e o tratamento precoces são factores determinantes para se evitar ou atrasar o aparecimento das graves alterações degenerativas osteoarticulares, potencialmente invalidantes, e as manifestações sistémicas da doença. O fenómeno das «urinas escuras» deve ser devidamente valorizado pelos pediatras, como um sinal precoce de reconhecimento desta patologia.

**Agradecimento:** Ao Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba, da Fundación Jimenez Diaz (Madrid), pela valiosa colaboração na análise mutacional dos doentes.

#### Bibliografia

1. La Du BN. Alkaptonuria. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, Inc, 7th edition, 1995: 1371-86.
2. Nyhan WL, Ozand PT. Alkaptonuria. In: *Atlas of Metabolic Diseases*. Chapman & Hall Medical, 1998: 104-8.
3. Rodríguez de Córdoba S. Bases Moleculares de la alkaptonuria. In: Alonso JR, Bóveda MD, Castiñeiras DE, Cocho JA, Couce ML, Fraga JM, Iglesias AJ, eds. *Errores del Metabolismo 2000*. Santiago de Compostela, 1999: 23-6.
4. Scriver CR. Alkaptonuria: such a long journey. *Nature Genetics* 1996; 14: 5-6.
5. La Du BN Jr. Are we ready to try to cure Alkaptonuria? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 765-7.
6. Fernández-Cañón JM, Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, Renedo M, Fernández-Ruiz E, Peñalva MA, Rodríguez de Córdoba S. The molecular basis of Alkaptonuria. *Nature Genetics* 1996; 14: 19-24.
7. Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, Fernández-Cañón JM, Peñalva MA, Rodríguez de Córdoba S. The human Homogentisate 1,2-Dioxygenase (HGO) gene. *Genomics* 1997; 43: 115-22.
8. Beltrán-Valero de Bernabé D, Granadino B, Chiarelli I, Porfirio B, Mayatepek E, Aquaron R, Moore MM, Festen JJM, Sanmartí R, Peñalva MA, Rodríguez de Córdoba S. Mutation and Polymorphism Analysis of the Human Homogentisate 1,2-Dioxygenase Gene in Alkaptonuric Patients. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 776-84.
9. Beltrán-Valero de Bernabé D, Jimenez FJ, Aquaron R, Rodríguez de Córdoba S. Analysis of Alkaptonuria (AKU) Mutations and Polymorphisms Reveals that the CCC Sequence Motif is a Mutational Hot Spot in the Homogentisate 1,2-Dioxygenase Gene (HGO). *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1316-22.
10. de Haas V, Weber ECC, de Klerk JBC, Bakker HD, Smit GPA, Huijbers WAR, Duran M, Poll-The BT. The success of dietary protein restriction in alkaptonuric patients is age-dependent. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 791-8.