

Acidúria L2-hidroxi-glutárica: circulação do gene em cães da raça Staffordshire Bull Terrier no Brasil em 2008-2015¹

Durval Baraúna Júnior^{2*}, Cássia Regina O. Santos², Ana Catarina L. Albinati²,
Fernanda Gomes C. Monteiro³ e Eduardo Alberto Tudury⁴

ABSTRACT. Baraúna Júnior D., Santos C.R.O., Albinati A.C.L., Monteiro F.G.C. & Tudury E.A. 2016. [L2-hydroxyglutaric aciduria: circulation of the gene in Staffordshire Bull Terrier dogs in Brazil (2008-2015).] Acidúria L2-hidroxi-glutárica: circulação do gene em cães da raça Staffordshire Bull Terrier no Brasil (2008-2015). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(10):1021-1024. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, BR-407 Km 12, Lote 543, Distrito de Irrigação Senador Nilo Coelho, Zona Rural, Petrolina, PE 56300-990, Brasil. E-mail: durvalbarauna@hotmail.com

The aim of this study was to identify the presence of a mutation in the L2-hydroxyglutarate dehydrogenase (L2-HGDH) gene in Staffordshire bull terriers in Brazil. Genetic testing was done in 76 dogs from different regions of the country, from 2008 to 2015. Fifty-five dogs (72.37%) were free of the mutant gene L2HGDH or homozygous-dominant, and 21 (27.63%) were carriers for the mutant gene or heterozygous. No homozygous recessive dogs (affected) were found, however, it is worth noting that the gene circulates in Brazil and that affected dogs can appear.

INDEX TERMS: L2-hydroxyglutaric aciduria, Staffordshire Bull Terrier, dogs, circulation of gene mutant L2-HGDH.

RESUMO. O objetivo do trabalho foi identificar a presença no Brasil do gene mutante L2HGDH em cães da raça Staffordshire Bull Terrier (SBT). Para tanto foi feito o teste genético em 76 cães provenientes de diferentes regiões do Brasil, no período de 2008 a 2015, sendo encontrados 55 animais (72,37%) livres do gene mutante L2-HGDH ou homozigotos dominantes, e 21(27,63%) portadores do gene mutante ou heterozigotos. Não foi encontrado nenhum animal homozigoto recessivo (afetado), porém pode-se observar que o gene circula no Brasil e que cães afetados podem aparecer.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Acidúria L2-hidroxi-glutárica, cães Staffordshire Bull Terrier, circulação do gene mutante L2-HGDH.

INTRODUÇÃO

Acidúria L2-hidroxi-glutárica (L2-HGA) é um erro raro inato do metabolismo que foi descrito pela primeira vez em humanos em 1980 (Duran et al. 1980) e posteriormente em cães (Abramson et al. 2003, Garosi et al. 2005, Farias et al. 2012). L2-HGA é herdada como doença autossômica recessiva em cães e humanos (Penderis et al. 2007).

A enfermidade é caracterizada pela elevação de ácido L2-hidroxi-glutárico (L2-HG) na urina, plasma e fluido cerebrospinal (Duran et al. 1980, Garosi et al. 2005). O excesso de ácido L-2-HG afeta o sistema nervoso central e seus sinais clínicos são normalmente aparentes entre seis meses e um ano de idade, porém pode ocorrer mais tardiamente, com relato de até sete anos de idade em cão (Garosi et al. 2005). A L2-HGA é produzida quando a enzima mitocondrial, L-malato desidrogenase não é específica para seu substrato primário, oxalacetato, mas é capaz de reduzir α -ketoglutarato para ácido hidroxi-glutárico (L2-HG) (Böhm et al. 2014).

Abramson et al. (2003) relataram seis casos em cães da raça Staffordshire Bull Terrier (SBT) com sinais clínicos neurológicos (ataxia, demência, alteração de comportamento e tremores de cabeça), que iniciaram entre quatro meses a sete anos de idade. O diagnóstico para L-2-HGA foi

¹ Recebido em 3 de dezembro de 2015.

Aceito para publicação em 12 de maio de 2016.

² Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Campus Ciências Agrárias, BR-407 Km 12, Lote 543, Distrito de Irrigação Senador Nilo Coelho, Zona Rural, Petrolina, PE 56.300-990, Brasil. *Autor para correspondência: durvalbarauna@hotmail.com

³ Clínica Privada, Estrada Jose Duarte 24D, Rio de Janeiro, RJ 22783240, Brasil.

⁴ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

confirmado por meio de exames laboratoriais, que revelaram níveis de ácido L2-HG elevados em urina, líquido cerebrospinal e plasma. Além disso, as imagens da ressonância magnética sugeriram doença metabólica ou tóxica. Böhm et al. (2014) descreveram o primeiro relato de L2-HGA em um cão da raça SBT, na África do Sul, utilizaram a PCR, além da pesquisa do nível da enzima na urina e ressonância magnética para avaliação das lesões no sistema nervoso.

Os sinais clínicos incluem, em geral, convulsões, ataxia, tremores de cabeça, rigidez muscular resultante de exercício ou excitação, e demência. Não há cura para a enfermidade, apenas tratamento sintomático (Abramson et al. 2003, Garosi et al. 2005).

O diagnóstico é realizado através da detecção da elevação de ácido L2-HG na urina (valores de referência: 2,8-17mmol), mas aumento de L2-HG no plasma e fluido cerebrospinal também são consistentes (Abramson et al. 2003, Scurrrell et al. 2008). Ressonância magnética revela uma polioencefalopatia simétrica bilateral (Abramson et al. 2003, Garosi et al. 2005, Böhm et al. 2014).

O diagnóstico pode ainda, ser confirmado através de testes de DNA. Pesquisas genéticas em cães da raça SBT revelaram que a condição esta associada com duas únicas mutações de substituição dentro do exon 10 do gene que codifica para a L2-hidroxioglutarato desidrogenase (L2HGDH) (Penderis et al. 2007).

Objetivou-se identificar e notificar a circulação do gene mutante L2-HGDH em cães da raça SBT no Brasil, no período de 2008 a 2015.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezessete criadores de cães da raça Staffordshire Bull Terrier de diferentes regiões do Brasil (nordeste, sudeste e centro-oeste) foram contatados e cederam material de 76 animais para este estudo, entre 2008 e 2015. Todos os animais testados tinham pedigree registrado na Confederação Brasileira de Cinofilia e o estudo foi autorizado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA)/UFRPE, licença 109/15. Os autores deste trabalho se comprometeram em não divulgar nomes de criadores ou de animais testados. O material coletado foi utilizado para testes genéticos realizados com kits importados adquiridos dos laboratórios Animal Health Trust - Reino Unido e Vetgen - Estados Unidos da América, e seguiu-se as instruções para coleta e submissão do material, recomendadas pelos mesmos. As amostras foram coletadas através de swabs da mucosa oral realizando uma fricção intensa da face interna da bochecha, cerca de vinte vezes, seguido de um período de secagem da amostra ao ar livre por 15 minutos, e então colocada em envelopes de papel e enviada para o laboratório. O teste possibilita as seguintes informações: cães livres do gene ou homocigotos dominantes AA, cães portadores do gene ou heterocigotos Aa e cães afetados pela doença ou homocigotos recessivos aa. Cabe salientar que todos os testes foram realizados no período citado durante exames de rotina, e os resultados foram cedidos pelos proprietários para execução desse estudo com os devidos termos de consentimento.

RESULTADOS

Dos 76 cães da raça SBT analisados nesta pesquisa, 55 (72,37%) foram considerados livres do gene mutante L2-HGDH, e 21(27,63%) foram heterocigotos para o gene mu-

tante L2-HGDH. Os cães testados foram provenientes das regiões nordeste (10 livres do gene mutante, 1 heterocigoto), sudeste (38 livres do gene mutante e 18 heterocigotos) e centro-oeste (7 livres do gene mutante, 1 heterocigoto). Não se identificou nenhum cão homocigoto recessivo O teste genético realizado neste trabalho revelou que 72,37% dos cães analisados são livres do gene mutante L2HGDH (homocigotos dominantes), 27,63% são portadores do gene L2HGDH (heterocigotos).

DISCUSSÃO

A L2-HGDH é uma desordem que apresenta uma herança autossômica recessiva com duas cópias do gene defeituoso, um herdado do pai e outro herdado da mãe. Indivíduos com uma cópia do gene defeituoso e outra cópia normal são portadores, podem passar o gene com a mutação para sua descendência, mas não apresentam sinais clínicos da enfermidade (Animal Health Trust 2015).

A identificação do gene mutante possibilita a melhora nos programas de acasalamento dos criadores, evitando desta forma o acasalamento entre cães heterocigotos Aa x Aa, onde 25% serão livres do gene mutante AA, 25% de doentes para L-2-HGA e 50% de heterocigotos, ou ainda acasalamentos entre cães heterocigotos Aa com homocigotos recessivos aa, onde 50% serão heterocigotos portadores do gene L2HGDH e 50% de cães doentes, ou no caso extremo, entre acasalamentos de cães doentes aa x aa, onde 100% dos filhotes nascerão com a doença. Binns (2007) afirma que graças aos testes de detecção de doenças recessivas com base no DNA, os criadores dispõem de variadas opções que melhoram o bem-estar dos seus cães. O principal objetivo da realização dos testes é evitar o acasalamento de indivíduos portadores, uma vez que originará cães afetados. Short et al. (2010) relatam que muitos cães vêm sendo testados para essa mutação antes da criação para reduzir a incidência dessa alteração na raça.

Até a presente data mais de 100 casos da doença foram relatados em humanos (Steenweg et al. 2010, Kranendijk et al. 2012). Na Medicina Veterinária a maioria dos casos relatados foram em cães da raça SBT (Abramson et al. 2003, Böhm et al. 2014), mas também em três Yorkshire Terriers (Sanchez-Masian et al. 2012, Farias et al. 2012), e em um West Highland White Terrier (Garosi et al. 2005). Garosi et al. (2005), encontraram sinais clínicos neurológicos semelhantes aos descritos para esta enfermidade em um cão da raça West Highland White Terrier, o diagnóstico foi confirmado pelo aumento expressivo do ácido L-2-HG na urina e por meio dos achados de imagem de ressonância magnética.

Os testes laboratoriais de rotina realizados em cães afetados como perfil hematológico e bioquímico, eletrólitos, cortisol, amônia, análise de urina e fezes revelam-se normais (Theobald 2011). Alguns testes como a mensuração de enzimas hepáticas, podem revelar-se alterados devido ao uso de certas drogas, como o fenobarbital, realizada em animais que apresentam convulsões (Scurrrell et al. 2008, Böhm et al. 2014). Assim, os testes laboratoriais de rotina não ajudam no diagnóstico da doença. Nos casos suspeitos, a opção é identificação de ácidos orgânicos pela cromato-

grafia gasosa acoplada a espectrometria de massa para detecção da elevação de L-2-HG na urina, no plasma e fluido cerebrospinal, contudo estes testes não identificam cães heterozigotos.

Além do diagnóstico clínico e confirmação principalmente pela quantificação da enzima na urina, os testes de triagem genética, com base no DNA tem revelado diversas vantagens, pois quando a mutação responsável por uma doença é identificada, fica mais fácil elaborar testes rápidos, precisos e menos dispendiosos (Binns 2007). O teste genético aparece como uma ferramenta simples, rápida e segura para o diagnóstico de cães suspeitos da doença e identificação dos heterozigotos. Certamente o maior entrave para o rastreamento do gene em um número maior de animais é a não realização e obrigatoriedade do teste no Brasil, o que não acontece em outros países, como a Inglaterra, onde para o registro de animais da raça SBT no The Kennel Club, a realização do teste é obrigatória.

A determinação do pedigree e a ocorrência de animais afetados dentro do pedigree fornece informação valiosa sobre o modo de herança de algumas doenças (Sewell et al. 2007), porém no Brasil ainda não é obrigatório a realização de testes de saúde para registro de pedigree. Os cães utilizados nesse trabalho são provenientes de criadores que tiveram interesse em realizar os testes e por esse motivo, acredita-se que os mesmos façam um controle nos acasalamentos, no entanto com a popularização da raça e o percentual de 27,63% de portadores do gene, pode-se esperar um crescimento no número de cães portadores do gene e o aparecimento de cães afetados.

O teste genético realizado neste trabalho revelou que 72,37% dos cães analisados são livres do gene mutante L2-HGDH (homozigotos dominantes), ou seja, possuem duas cópias normais do gene e não desenvolverão L-2-HGA, nem passarão uma cópia do gene L2-HGDH para qualquer um dos seus descendentes. Vinte e um cães (27,63%) são portadores do gene L2-HGDH (heterozigotos), isso significa que possuem uma cópia do gene normal e uma cópia do gene mutante que causa a L2-HGA. A Animal Health Trust (2015) publicou em suas estatísticas, que até 31 de dezembro de 2014, dos 7720 cães da raça Staffordshire Bull Terrier testados em seu laboratório de todas as partes do mundo, 6467 (83,76%) eram homozigotos dominantes AA, 1150 (14,84%) heterozigotos Aa e 103 (1,33%) homozigotos recessivos aa. Dado publicados por dois laboratórios, revelaram 14,84% de cães da raça SBT heterozigotos para o gene L2-HGDH e 1,33% de homozigotos recessivos, em exames realizados com material de cães de diferentes partes do mundo (Animal Health Trust 2015), em testes realizados na África do Sul foi encontrado 23% de cães da raça SBT heterozigotos para o gene L2-HGDH e 2% de homozigotos recessivos (Böhm et al. 2014).

Outro laboratório comercial a Inqaba Biotec testou 200 cães da raça Staffordshire Bull Terrier da África do Sul, entre 2009 e 2012, sendo que os dados revelaram: 150 (75%) de cães homozigotos dominantes 46 (23%) cães heterozigotos e 4 (2%) de cães homozigotos recessivos (Böhm et al. 2014). Em um estudo genético realizado com 130 SBT do Reino Unido, 116 (89%) eram homozigotos dominantes,

14 (11%) heterozigotos e nenhum homozigoto recessivo, no mesmo estudo foram avaliados 131 SBT da Finlândia, obteve-se os mesmos resultados 89% homozigotos dominantes e 11% heterozigotos, porém quando o estudo foi realizado com 52 SBT epiléticos, foi obtido um resultado de 42 (81%) homozigotos dominantes, 8 (15%) heterozigotos e 2 (4%) homozigotos recessivos (Short et al. 2010). Comparando os resultados encontrados nesse trabalho com o de outros países, nota-se que o Brasil apresenta um percentual maior de cães portadores do gene L2HGDH, porém não apresentou nenhum homozigoto recessivo. Considerando-se os resultados publicados, pode-se esperar entre 1 e 2 % de cães homozigotos recessivos no Brasil, talvez um pouco mais, já que o número de heterozigotos no pool genético brasileiro é maior que os apresentados pelos trabalhos consultados.

Os cães heterozigotos não desenvolveram a enfermidade, mas passarão o gene L2-HG em média 50% para sua descendência. Quando há animais afetados, isso quer dizer que o cão tendo duas cópias do gene de mutação L2-HG, em algum momento vai desenvolver sinais clínicos da doença, e irá passar o gene da mutação para 100% da prole (Animal Health Trust 2015). Isso é de extrema importância visto que foram relatados casos de aparecimento de sinais clínicos em cães com sete anos de idade, que já poderiam estar incluídos em programas de reprodução. Para Elguero et al. (2014) a detecção direta da mutação, em doenças autossômicas recessivas, apresenta a vantagem como a realização deste em uma idade precoce, sem a necessidade de o animal ser afetado pela doença, ou vir sofrer alguma alteração em consequência da ineficiência diagnóstica da maioria dos procedimentos bioquímicos.

No presente trabalho não se identificou nenhum cão homozigoto recessivo, entretanto recomenda-se uma maior vigilância na doença por parte dos médicos veterinários no Brasil, em virtude dos 27,63% heterozigotos apresentados. Vale ressaltar que até o momento não existe no Brasil, um laboratório habilitado para a realização de teste para identificação do gene L2-HGDH, o que acaba dificultando a realização do mesmo, apesar da importação do kit ser relativamente fácil.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o gene mutante L2-HGDH circula no Brasil em cães da raça Staffordshire Bull Terrier.

Com a maior divulgação da existência circulante do gene no Brasil, laboratórios nacionais poderão incluir os testes genéticos para o gene L2-HGDH, ampliando o número de cães testados e diagnosticando precocemente possíveis afetados.

REFERÊNCIAS

- Abramson C.J., Platt S.R., Jacobs C., Verhoeven N.M., Dennis R., Garosi L. & Shelton G.D. 2003. L2-Hydroxyglutaric Aciduria in Staffordshire Bull Terriers. *J. Vet. Intern Med.* 17(4):551-556.
- Animal Health Trust 2015. Disponível em <<http://www.ahtdnatesting.co.uk>> Acesso em 20 jan. 2015.
- Binns M. 2007. Triagem genética em cães. *Vet. BFocus* 17(2):18-24,

- Böhm M., Henderson H., Van der Zwan H. & Basson S. 2014. L-2 hydroxyglutaric aciduria in a South African Staffordshire Bull Terrier. *J. South African Vet. Assoc.* 85(1):1-5.
- Duran M., Kamerling J.P., Bakker H.D., Van Gennip A.H. & Wadman S.K. 1980. L2-hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism? *J. Inherit. Metab. Dis.* 3(4):109-112.
- Elguero B., Martínez M. & Gómez N.V. 2014. Atrofia progressiva de retina associada a mutação do gene PRCD- método de detecção genética em cães. *Clín. Vet.* 19(113):44-50.
- Farias F.H., Zeng R., Johnson G.S., Shelton C.D. & Paquette D. 2012. A L2-HGDH initiator methionine codon mutation in a Yorkshire terrier with L2-hydroxyglutaric aciduria. *BMC Vet. Res.* 8(124):1-4.
- Garosi L.S., Penderis J., McConnell J.F. & Jakobs C. 2005. 'L-2-hydroxyglutaric aciduria in a West Highland white terrier. *Vet. Rec.* 156(5):145-147.
- Kranendijk M., Struys E.A., Salomons G.S., Van der Knaap M.S. & Jakobs C. 2012. Progress in understanding 2-hydroxyglutaric acidurias. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35(4):571-587.
- Penderis J., Calvin J., Abramson C., Jakobim S.C., Pettitt L., Binns M.M., Verhoeven N.M., O'Driscoll E., Platt S.R. & Mellersh C.S. 2007. L2-hydroxyglutaric aciduria: characterisation of the molecular defect in a spontaneous canine model. *J. Med. Genet.* 44(5):334-340.
- Sanchez-Masian D.F., Artuch R., Mascort J., Jakobs C., Salomons G., Zamora A., Casado M., Fernandez M., Recio A. & Lujan A. 2012. L2-hydroxyglutaric aciduria in two female Yorkshire terriers. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 48(5):366-371.
- Scurrrell E., Davies E., Baines E., Cherubini G.B., Platt S., Blakemore W., Williams A. & Schoniger S. 2008. Neuropathological findings in a Staffordshire bull terrier with L2-hydroxyglutaric aciduria. *J. Comp. Pathol.* 138(2/3):160-164.
- Sewell A.C., Haskins M.E. & Giger U. 2007. Inherited metabolic disease in companion animals: searching for nature's mistakes. *Vet. J.* 174(2):252-259.
- Short A.D., Mellersh C.S., Platt H., Carter S.D., Timofte D., Lohi H. & Ollier W.E. 2010. Exonic mutations in the L2-HGDH gene in Staffordshire bull terriers. *Vet. Rec.* 167(12):455-457.
- Steenweg M.E., Jakobs C., Errami A., Van Dooren S.J., Adeva Bartolomé M.T., Aerssens P., Augoustides-Savvapoulou P., Baric I., Baumann M., Bonafé L., Chabrol B., Clarke J.T., Clayton P., Coker M., Cooper S., Falik-Zaccari T., Gorman M., Hahn A., Hasanoglu A., King M.D., De Klerk H.B., Korman S.H., Lee C., Meldgaard Lund A., Mejaski-Bosnjak V., Pascual-Castroviejo I., Raadhyaksha A., Rootwelt T., Roubertie A., Ruiz-Falco M., Scalais E., Schimmel U., Seijo-Martinez M., Suri M., Sykut-Cegielska J., Trefz F., Uziel G., Valayannopoulos V., Vianey-Saban C., Vlaho S., Vodopiutz J., Wajner M., Walter J., Walter-Derbort C., Yapici Z., Zafeiriou D.I., Spreeuwenberg M.D., Celli J., Den Dunnen J.T., Van der Knaap M.S. & Salomons G.S. 2010. An overview of L2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene (L2-HGDH) variants: a genotype - phenotype study. *Hum. Mutat.* 31(4):380-390.
- Theobald A. 2011. L2- hydroxyglutaric aciduria: canine progressive neurological dysfunction. *Vet. Times* 41(44). Disponível em <<http://www.vetsonline.com/publications/veterinary-times/archives/n-41-44/l-2-hydroxyglutaric-aciduria-canine-progressive-neurological-dysfunction.html>> Acesso em 10 fev. 2015.