

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAROLINE FLORES DE OLIVEIRA

**Investigação clínica e genética da ataxia por deficiência de vitamina E (AVED),  
uma forma tratável de doença neuromuscular**

São Paulo

2019

CAROLINE FLORES DE OLIVEIRA

**Investigação clínica e genética da ataxia por deficiência de vitamina E (AVED), uma forma tratável de doença neuromuscular**

Versão original

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de Mestre  
em Ciências – Programa Mestrado  
Profissional em Aconselhamento  
Genético e Genômica Humana. Área de  
Concentração: Biologia (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Fernando Kok

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo autor no formulário: <http://www.ib.usp.br/biblioteca/ficha-catalografica/ficha.php>

Oliveira, Caroline  
Investigação Clínica e Genética da Ataxia por  
Deficiência de Vitamina E (AVED), uma Forma Tratável de  
Doença Neuromuscular / Caroline Oliveira; orientador  
Fernando Kok. -- São Paulo, 2019.

64

f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e  
Biologia Evolutiva.

1. Ataxia autossômica recessiva. 2. Ataxia com  
deficiência de vitamina E. 3. Genética. 4. Ataxia. 5.  
Vitamina E. I. Kok, Fernando, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura da catalogação da publicação:

Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

## Resumo

A Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED) é uma doença neurodegenerativa e progressiva caracterizada principalmente por ataxia espinocerebelar progressiva, arreflexia, disartria, propriocepção prejudicada e acentuada deficiência de vitamina E no plasma. Possui alta semelhança clínica com a forma mais comum de ataxia autossômica recessiva, a ataxia de Friedreich (AF), na qual é muitas vezes confundida. A AVED desenvolve-se em decorrência de mutação no gene que codifica a proteína de transferência de alfa-tocoferol (TTPA) e possui padrão de herança autossômica recessiva. O tratamento consiste em suplementação com altas doses diárias de vitamina E. O presente estudo teve como objetivo avaliar, do ponto de vista clínico e genético, uma série de 9 pacientes diagnosticados com AVED em acompanhamento no Ambulatório de Neurogenética do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-FMUSP) e comparar os dados obtidos com a literatura mundial, assim como oferecer Aconselhamento Genético aos pacientes e suas famílias. A coleta de dados foi realizada no Ambulatório de Neurogenética do HC-FMUSP. Para a avaliação funcional, foi utilizada a escala *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA). O material genético dos participantes foi sequenciado por sequenciamento de nova geração (NGS) e analisado por programas de bioinformática. Ao todo, 5 mutações foram identificadas, sendo a p.Thr172Leufs\*5 a mais frequente, seguida da p.Glu249Asnfs\*15, ambas relatadas na literatura como sendo responsáveis por uma forma grave da doença. Também foi identificada a mutação missense p.Ala120Thr e duas variantes nunca antes descritas na literatura: p.Ala58Pro e p.Arg134Pro. Este estudo demonstrou que, em concordância com a literatura, a suplementação com vitamina E em pacientes com AVED cessou a progressão da doença nos pacientes investigados. De modo geral, mutações que causem a perda de função do gene estão associadas a início precoce dos sintomas e progressão rápida, enquanto que variantes missense tendem a causar um quadro mais leve da doença. Esta relação, entretanto, tem exceções. A investigação molecular do gene TTPA dos pacientes com diagnóstico clínico e bioquímico de AVED deve ser preconizado, uma vez que auxilia no Aconselhamento Genético e prognóstico da doença.

## Abstract

Ataxia with vitamin E deficiency (AVED) is a progressive and neurodegenerative disease mainly characterized by progressive spinocerebellar ataxia, areflexia, dysarthria, impaired proprioception and marked reduced plasma levels of vitamin E. Clinically, it resembles the most common form of recessive autosomal ataxia, Friedreich ataxia (FA). AVED develops as a result of mutation in the gene encoding alpha-tocopherol transfer protein (TTPA) and is inherited in an autosomal recessive inheritance pattern. The treatment consists of supplementation with high doses of vitamin E. The present study aimed to evaluate, from the clinical and genetic point of view, 9 patients diagnosed with AVED under follow-up at the Neurogenetics Out-Patient Service of Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-FMUSP) and compare the data obtained with the world literature, as well as offer genetic counseling to patients and their families. Data collection was performed at the Neurogenetics Ambulatory of HC-FMUSP. For a functional assessment, the Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) was performed. Participants' genetic material was sequenced by next generation sequencing (NGS) and analyzed by bioinformatics softwares. At all, 5 mutations were identified. The p.Thr172Leufs\*5 mutation was the most frequent, followed by p.Glu249Asnfs\*15, both reported in the literature associated as a severe form of the disease. It was also identified the missense mutation p.Ala120Thr and two variants never reported in the literature before: p.Ala58Pro and p.Arg134Pro. This study showed that, in accordance with the literature, vitamin E supplementation in patients with AVED ceased disease progression in the investigated patients. In general, mutations that cause loss of gene function are associated with early onset of symptoms and rapid progression, while missense variants tend to cause a milder picture of the disease. This relationship, however, has exceptions. Molecular investigation of the TTPA gene of patients with clinical and biochemical diagnosis of AVED should be recommended, as it helps in genetic counseling and disease prognosis.

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1 Ataxias</b> .....	<b>12</b>
1.1.1 Ataxia Ligada ao Cromossomo X: .....	13
1.1.2 Ataxias Autossômicas Dominantes:.....	13
1.1.3 Ataxias Autossômicas Recessivas: .....	14
<b>1.2 Vitamina E</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3 Proteína de Transferência de <math>\alpha</math>-tocoferol</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4 Fisiopatologia da Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED)</b> .....	<b>22</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>27</b>
<b>3. Justificativa</b> .....	<b>27</b>
<b>4. Metodologia e Casuística</b> .....	<b>28</b>
<b>5. Resultados</b> .....	<b>31</b>
<b>5.1 Família A, paciente A1</b> .....	<b>31</b>
<b>5.2 Família B, Paciente B1:</b> .....	<b>33</b>
<b>5.3 Família C:</b> .....	<b>35</b>
5.3.1 Paciente C1 .....	35
5.3.2. Paciente C2 .....	36
<b>5.4. Família D, Paciente D1:</b> .....	<b>38</b>
<b>5.5 Família E, Paciente E1:</b> .....	<b>40</b>
<b>5.6. Família F, Pacientes F1 e F2:</b> .....	<b>42</b>
<b>5.8 Família G, Paciente G1:</b> .....	<b>44</b>
<b>6. Discussão</b> .....	<b>46</b>
<b>7. Conclusões</b> .....	<b>50</b>
<b>8. Referências Bibliográficas:</b> .....	<b>52</b>
<b>9. Material Complementar</b> .....	<b>55</b>
<b>9.1 Escala para avaliação e graduação de ataxia (SARA)</b> .....	<b>55</b>

# 1. Introdução

Ataxia com Deficiência Isolada de Vitamina E, ou AVED, é um distúrbio progressivo e neurodegenerativo raro causado por mutação patogênica em homozigose ou heterozigose composta no gene TTPA que codifica a proteína de transferência de alfa-tocoferol (tocopherol transfer protein alpha). Sua prevalência varia com a região, oscilando entre 1 a 9 a cada um milhão de habitantes. É mais prevalente no Japão<sup>[2]</sup>, em populações mediterrâneas e no norte da África<sup>[3]</sup>. Presume-se que a deficiência de vitamina E ocasione danos oxidativos ao parasita Plasmodium, causador da malária, conferindo resistência a esta enfermidade aos indivíduos portadores de mutação patogênica no gene TTPA, o que possivelmente contribui para maior incidência desta ataxia nos países africanos<sup>[21,22]</sup>.

Assemelha-se muito a outra doença autossômica recessiva, a ataxia de Friedreich (AF), com a qual é muitas vezes confundida. A idade de início dos sintomas geralmente ocorre entre os 5 e 20 anos. O quadro clínico da AVED pode variar bastante. De forma geral, as principais manifestações clínicas são: ataxia cerebelar e sensitiva progressivas, arreflexia, disartria, dismetria, desequilíbrio e comprometimento da propriocepção, principalmente no sentido de vibração. Em alguns casos podem ocorrer titubação da cabeça, sinal de Babinski, pés cavos, distonia e alterações do movimento ocular. Retinite pigmentosa é mais freqüentemente observada em pacientes japoneses<sup>[2]</sup>. Do ponto de vista bioquímico, observa-se significativa redução dos níveis plasmáticos de vitamina E que, na ausência de tratamento, em geral encontra-se abaixo de 2,0 mg/L (valor de referência : de 5,0 A 20,0 mg/L)<sup>[1]</sup>. É uma das únicas formas de ataxia tratáveis, sendo a administração de altas doses diárias de vitamina E o tratamento preconizado (de 10 mg/kg até 40 mg/kg de peso corporal por dia)<sup>[1]</sup>. A administração diária de vitamina E exógena mantém a concentração deste nutriente dentro níveis capazes de proteger o sistema nervoso central (SNC) contra danos oxidativos. Se o tratamento for iniciado logo ao início do aparecimento das manifestações clínicas, é possível prevenir a progressão e até reverter certos sintomas. Se, no entanto, o diagnóstico e,

consequente, o início da suplementação de vitamina E forem tardios, é possível cessar a progressão da doença, porém os sinais já presentes são reversíveis de forma muito limitada.

Esta doença não é alvo de investigações no Brasil. Não se sabe, portanto, quais são as bases genéticas predominantes nos pacientes do país, não se têm estimativas acerca da sua prevalência na população brasileira e nem o tipo de tratamento que os pacientes estão recebendo. O diagnóstico de pacientes com AVED é majoritariamente feito considerando-se a ataxia cerebelar e sensitiva progressiva juntamente com a baixa concentração plasmática de vitamina E e excluindo-se defeitos na absorção intestinal de lipídios. O estudo genético não costuma ser realizado, o que torna o diagnóstico incompleto.

## 1.1 Ataxias

O termo “ataxia” refere-se a um transtorno neurológico caracterizado pela falta de coordenação de movimentos musculares voluntários e de equilíbrio. O equilíbrio e a coordenação são resultado de um complexo circuito envolvendo os gânglios da base, o cerebelo e o córtex cerebral, bem como as vias motoras e sensoriais periféricas. O mal funcionamento de qualquer parte deste circuito pode levar ao desequilíbrio e à incoordenação, ou ataxia, da marcha, dos membros, de movimentos oculares ou uma combinação dos mesmos<sup>[4]</sup>.

A ataxia pode ser um sintoma de um distúrbio multissistêmico, pode se manifestar como o principal componente de uma doença ou pode ser resultante de uma lesão ao SNC provocada por agentes externos, como vírus, drogas ou trauma<sup>[4]</sup>. Podem ser adquiridas, herdadas ou não terem etiologia definida.

Acidentes vascular e eventos anóxicos globais, tumores, trauma e doenças desmielinizantes (tais como esclerose múltipla) são causas comuns de ataxia adquirida. Outras causas incluem anomalias congênitas, infecção, autoimunidade e deficiências vitamínicas. O álcool é um importante agente tóxico para o cerebelo e seu consumo excessivo e prolongado leva à degeneração cerebelar. Alguns medicamentos, como certos quimioterápicos e drogas antiepilépticas, também estão associados a sinais cerebelares agudos quando em doses



elevadas. A ataxia também pode ser causada por síndromes infecciosas ou pós-infecciosas envolvendo o cerebelo, tronco cerebral ou ambos, como por exemplo, após infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV)<sup>[4]</sup>.

As ataxias hereditárias, por outro lado, decorrem de malformação do sistema nervoso central ou defeito em vias responsáveis pela manutenção da função do cerebelo. Elas podem ser herdadas com um padrão de herança autossômico ou ligado ao X, dominante ou recessivo.

### **1.1.1 Ataxia Ligada ao Cromossomo X:**

A Síndrome de Tremor/Ataxia Associada ao X frágil (FXTAS) é um distúrbio causado por expansão da trinca de nucleotídeos CGG no gene FMR1, localizado no cromossomo X. Um alelo normal contém menos de 54 repetições. A mutação completa, que tem uma expansão de mais de 200 repetições CGG, causa a síndrome do X-frágil em pacientes do sexo masculino, caracterizado por deficiência intelectual, dismorfismos e, algumas vezes, transtorno do espectro autista. A presença da pré-mutação (de 55 a 200 repetições) é responsável por causar a FXTAS, cujas manifestações clínicas caracterizam-se por tremor, ataxia, parkinsonismo, disautonomia e distúrbios psiquiátricos em homens e, mais raramente, em mulheres. Pacientes do sexo feminino portadoras da pré-mutação no gene FMR1 podem apresentar insuficiência ovariana primária (POI) antes dos 40 anos de idade.

### **1.1.2 Ataxias Autossômicas Dominantes:**

As ataxias autossômicas dominantes (AD) ocorrem em várias as gerações em uma família afetada. Geralmente os sintomas surgem na fase adulta e o risco de transmissão do alelo mutado à prole é de 50%. Dentre as ataxias AD, as ataxias espinocerebelares progressivas (SCAs) são as mais frequentes, seguidas das ataxias episódicas (AE). Existem cerca de 37 SCAs, cujo mecanismo de expansão, geralmente da trinca CAG, codificando poliglutamina (SCA1, 2, 3, 6, 7, 12, 17 e DRPLA), mas também de CTG/CAG (SCA8), ATTCT (SCA10), TGGAA (SCA 31) e GGCCTG (SCA36) é o mais comum.

A SCA3, também conhecida como Doença de Machado-Joseph, é a ataxia AD mais frequente no mundo. Caracteriza-se por atrofia e fasciculações de face língua, disfagia, neuropatia, arreflexia, oftalmoparesia, declínio cognitivo, parkinsonismo e distonia.

As EAs são caracterizadas por episódios transitórios de ataxia, frequentemente associados a outras características como nistagmo e disartria, de duração variável.

### **1.1.3 Ataxias Autossômicas Recessivas:**

A maior parte das ataxias autossômicas recessivas (AR) caracteriza-se por ter início das manifestações clínicas entre a infância e a adolescência, em geral antes dos 20 anos de idade. Uma vez que ambos os alelos devem estar mutados, a consanguinidade parental aumenta o risco para formas AR de ataxia. Os casos são isolados na família ou incidem apenas na irmandade, sendo os genitores assintomáticos.

As ataxias autossômicas recessivas geralmente podem estar associadas à neuropatia sensório-motora periférica, principalmente à perda de propriocepção e senso de vibração. A característica principal de todos esses distúrbios é a ataxia espinocerebelar, tipicamente caracterizada por desequilíbrio com quedas, coordenação imprecisa das mãos, tremor postural ou cinético das extremidades ou tronco, disartria e disfagia. A arreflexia costuma ser um achado comum nas ataxias AR.

As formas de ataxia AR clinicamente mais semelhantes à AVED são a ataxia de Friedreich e a abetalipoproteinemia:

#### **1.1.3.1 Ataxia de Friedreich (FRDA)**

É a ataxia AR mais prevalente no mundo. Tipicamente manifesta-se na infância ou início da adolescência e caracteriza-se por ataxia lentamente progressiva, afetando a marcha e demais movimentos voluntários, neuropatia axonal sensitiva, arreflexia, escoliose, anormalidades de movimento ocular, disartria, disfagia, fraqueza muscular e ocasionalmente espasticidade, particularmente nos membros inferiores. Aproximadamente dois terços dos indivíduos com FRDA têm cardiomiopatia, até 30% têm diabetes mellitus. A progressão da doença leva muitas vezes à necessidade de uso de cadeira de rodas e ao aparecimento de

deformidades esqueléticas (principalmente escoliose) e de cardiomiopatia hipertrófica<sup>[4,5]</sup>. A neuroimagem não mostra degeneração cerebelar progressiva.

Em cerca de 98% dos pacientes, a doença é causada por uma expansão bialélica da repetição GAA localizada no íntron 1 de *FXN*, que codifica a proteína mitocondrial frataxina. Os alelos normais têm de 5 a 33 repetições de GAA, enquanto que 66 a mais de 1.000 repetições são observadas em alelos com expansão patogênica<sup>[4]</sup>.

Embora seu papel exato não seja claro, acredita-se que a frataxina esteja envolvida na transferência na mitocôndria de ferro para várias proteínas que contêm clusters de ferro-enxofre (Fe-S). A biogênese do cluster Fe-S depende fortemente da frataxina, cuja deficiência leva ao acúmulo de ferro na mitocôndria, disfunção da cadeia respiratória e aumento do estresse oxidativo<sup>[4]</sup>. O tratamento da AF é sintomático e de suporte.

#### **1.1.3.2 Abetalipoproteinemia:**

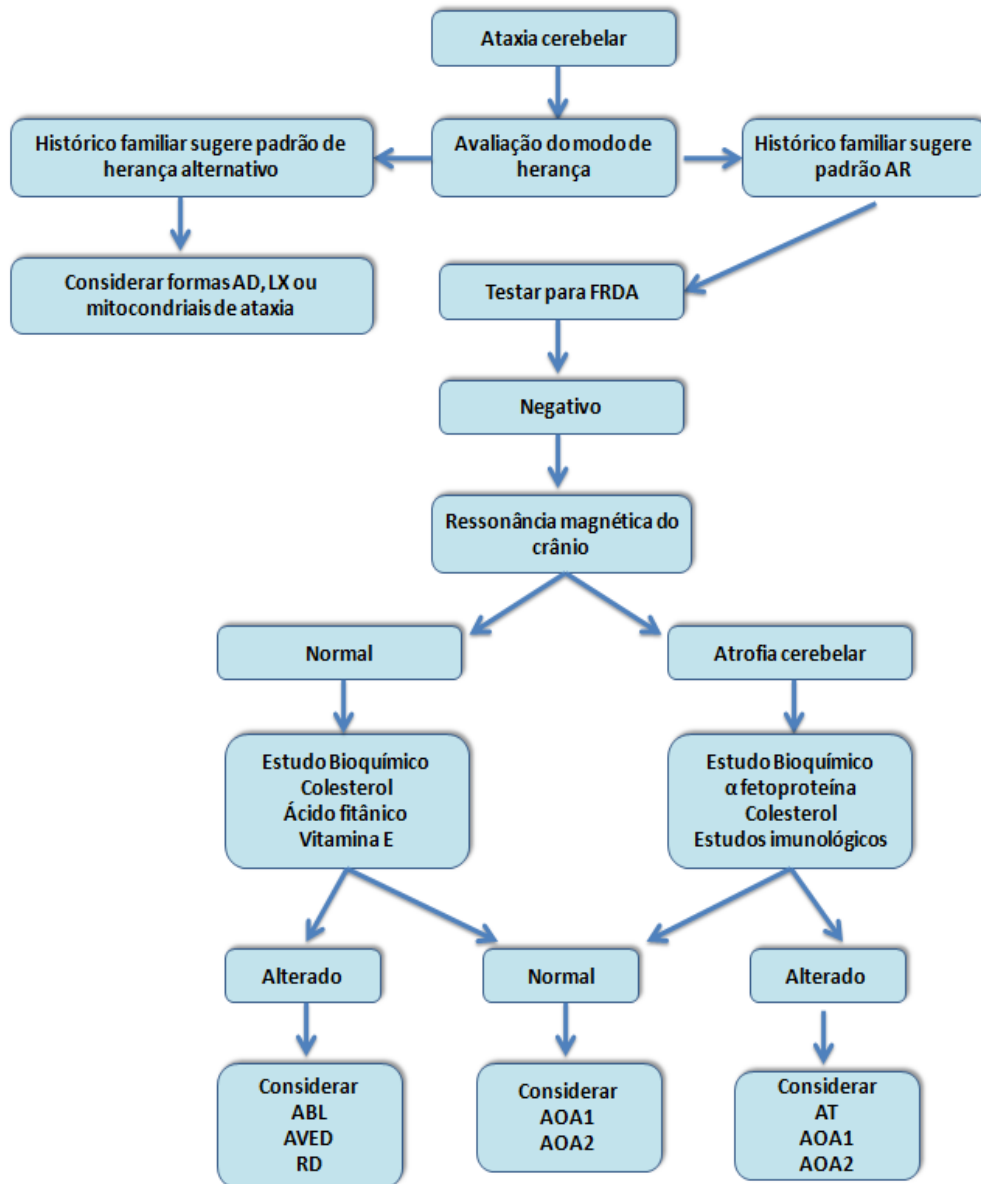
Na abetalipoproteinemia, assim como na AVED, a ataxia decorre de deficiência de vitamina E. No entanto, há também carência de outras vitaminas lipossolúveis, tais como A, D e K, em decorrência de falha na absorção intestinal de triglicerídeos microssomais, ocasionada por mutação bialélica em *MTTP* (4q23). A apresentação clínica é semelhante à AVED, porém é acompanhada de evidências de má absorção lipídica e baixo nível de LDL colesterol e apolipoproteína B, além de deficiência de vitaminas lipossolúveis, em contraste com a AVED, em que apenas a vitamina E encontra-se deficiente. Além do quadro atáxico bastante similar a da AVED, estes pacientes também podem apresentar retinite pigmentosa e o tratamento consiste na reposição vitamínica.

Além destas duas, outras formas de ataxia autossômicas recessivas consideradas diagnóstico diferencial da AVED estão sintetizadas na Tabela 1:

**Tabela 1:** Ataxias autossômicas recessivas clinicamente similares à AVED, gene causador e principais manifestações clínicas

<b>Ataxia</b>	<b>Gene</b>	<b>Principais manifestações clínicas</b>
Doença de Refsum (DR)	PHYH ou PEX7	Polineuropatia periférica, cerebelar, surdez neurosensorial, retinite pigmentosa, anosmia, alterações esqueléticas, ictiose, insuficiência renal e cardiomiopatia
Ataxia telangiectasia (AT)	ATM	Ataxia cerebelar, epilepsia, nistagmo, telangiectasias conjuntivas, hipogonadismo, imunodeficiência, infecções pulmonares frequentes e neoplasia.
Ataxia com apraxia oculomotora tipo 1 (AOA1)	APTX	Apraxia oculomotora, ataxia cerebelar, neuropatia periférica e coreoatetose. Menos frequentemente, hipoalbuminemia e hipercolesterolemia podem ocorrer.
Ataxia com apraxia oculomotora tipo 2 (AOA2)	SETX	Ataxia espinocerebelar e, raramente, apraxia oculomotora. As concentrações séricas de creatina quinase, $\gamma$ -globulina e $\alpha$ -fetoproteína são aumentadas.

Fogel e colaboradores, em uma revisão de 2007, sugerem que, na ausência de testes genéticos, o diagnóstico diferencial entre estas ataxias AR deve seguir o fluxograma representado na Figura 1:

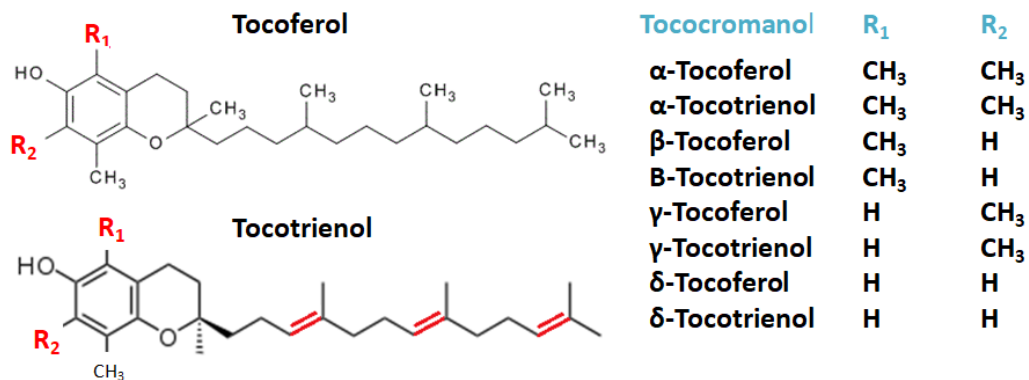


**Figura 1:** Fluxograma demonstrativo da avaliação diagnóstica clínica de um paciente com suspeita de ataxia hereditária autossômica recessiva. Fogel et al, 2007, adaptado.

## 1.2 Vitamina E

A vitamina E é uma molécula lipossolúvel encontrada no azeite de oliva, em sementes como amêndoa, macadâmia e castanha e em frutos, como nozes e avelã.

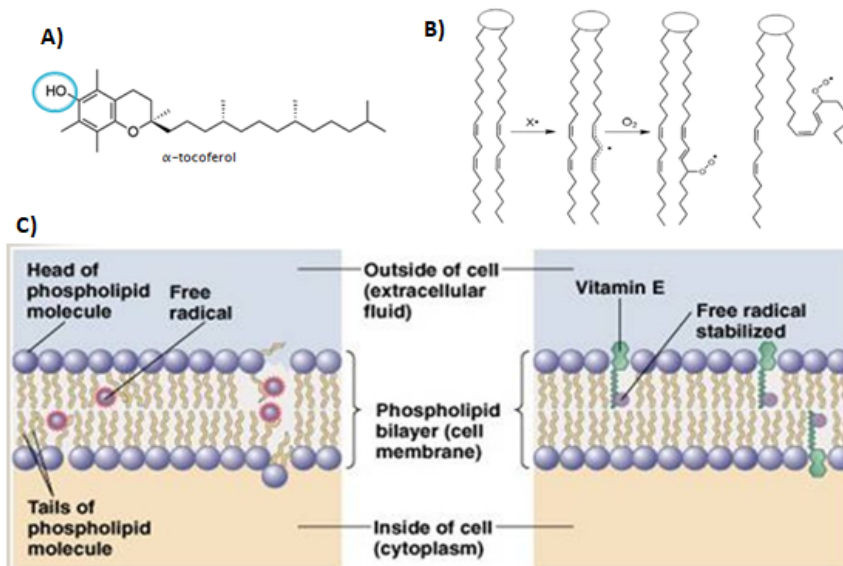
O termo “vitamina E” refere-se a uma família de lipídios vegetais neutros compostos de tocoferóis (cadeia lateral saturada) e tocotrienóis (cadeia lateral insaturada). Possui oito formas isoméricas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol e  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocotrienol), distinguindo-se pelo padrão de metilação no anel cromanol e pela insaturação na cadeia lateral isoprenóide (Fig 2). Todas as formas estão presentes na alimentação e são absorvidas no intestino delgado e transportadas em quilomícrons para o fígado. No fígado, o  $\alpha$ -tocoferol é seletivamente incorporado na lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) nascentes pela proteína de transferência de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TTP), e, então, entram na circulação<sup>[3,6,7]</sup>.



**Figura 2:** Família da vitamina E e seu oito isômeros.

O  $\alpha$ -tocoferol possui um grupo hidroxila que é altamente eletrofílico (Fig 3.A), capaz de sequestrar eficazmente radicais peróxidos instáveis, tornando a vitamina E um potente antioxidante<sup>[6]</sup>. Em membranas celulares, a cadeia lateral da molécula de vitamina E pode interagir com ácidos graxos poli-insaturados presentes nos fosfolipídios da membrana, ancorando a vitamina E em uma posição ideal para o sequestro de radicais livres pelo grupo hidroxila no anel cromanol<sup>[8]</sup>. Na sua ausência, as membranas plasmáticas dos neurônios acumulam radicais livres e as caudas dos fosfolipídios sofrem oxidação e degeneração (Fig 3.B), o que leva à deterioração das células do sistema nervoso, particularmente as cerebelares.

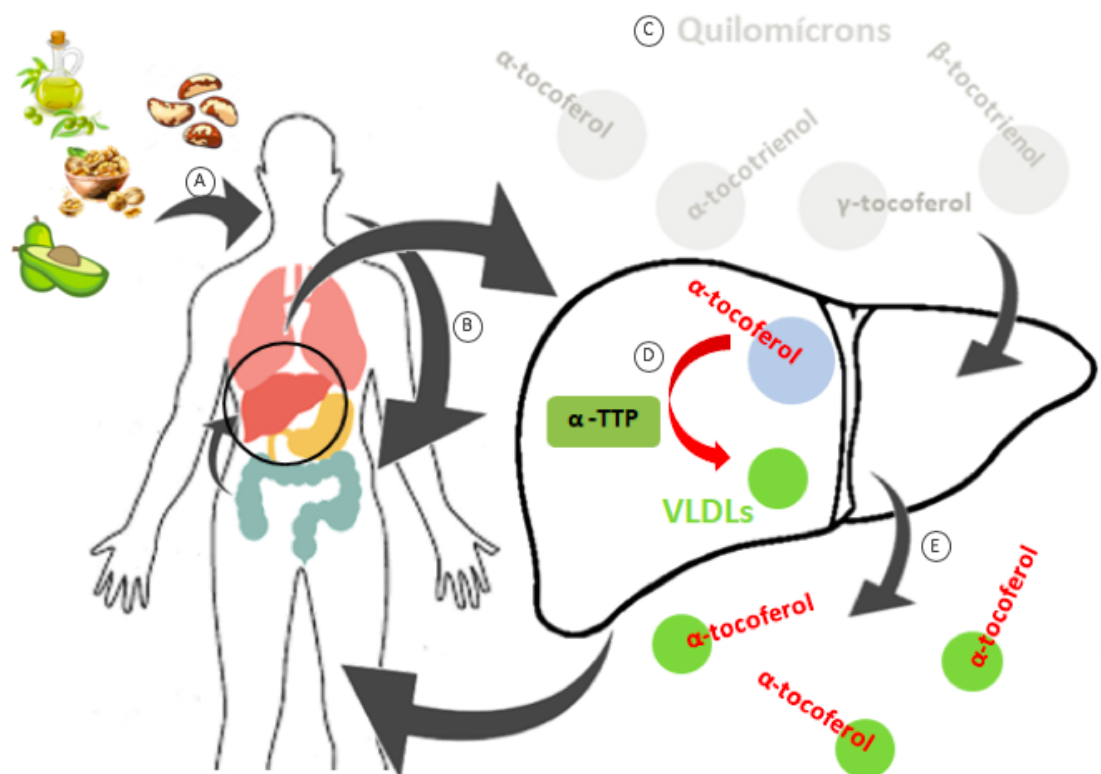
No cerebelo, sua ação antioxidante atua protegendo os fosfolípidios das membranas plasmáticas contra o estresse oxidativo causado por radicais livres, contribuindo para a manutenção e integridade das mesmas (Fig 3.C).



**Figura 3:** Atuação da  $\alpha$ -tocoferol nas membranas lipídicas. A) Estrutura da  $\alpha$ -tocoferol com destaque no radical hidroxila, responsável pela ação antioxidante. B) Atuação dos radicais livres das caudas fosfolipídicas na ausência de  $\alpha$ -tocoferol (Ref. Ulatowski et al, 2015. C) Ação antioxidante da  $\alpha$ -tocoferol nas membranas fosfolipídicas, atuando como sequestrador de radicais livres.

### 1.3 Proteína de Transferência de $\alpha$ -tocoferol

A proteína de transferência de  $\alpha$ -tocoferol, ou  $\alpha$ -TTP, é uma proteína citosólica hepática codificada por *TTPA*, localizado no braço longo do cromossomo 8 (8q13). O gene possui cinco éxons e codifica um produto de 278 aminoácidos. A proteína  $\alpha$ -TTP possui alta afinidade com o isômero de vitamina E  $\alpha$ -tocoferol, e, no fígado, liga-se seletivamente a ele entre todas as formas isoméricas de vitamina E presentes na alimentação e o incorpora a lipoproteínas de baixa (LDL) e, principalmente, de muito baixa densidade (VLDL). Após a incorporação, essas lipoproteínas atuam como transportadoras da  $\alpha$ -tocoferol do fígado para tecidos não hepáticos, principalmente o sistema nervoso (Figura 4), onde vai proporcionar uma proteção antioxidante às membranas celulares contra o estresse oxidativo causado por radicais livres.



**Figura 4:** Ciclo da vitamina E no organismo. A) Todas as formas isoméricas são ingeridas através da alimentação e B) absorvidas do intestino, C) onde são incorporadas a quilomícrons e entram em circulação. D) No fígado, entretanto, apenas o isômero  $\alpha$ -tocoferol será seletivamente incorporado a VLDLs pela proteína  $\alpha$ -TTP e, assim, E) permanece em circulação; as demais formas são eliminadas



A vitamina E, por ser o antioxidante lipossolúvel mais potente atuante na integridade das membranas biológicas, contribui para a proteção e estabilidade das mesmas. Na sua ausência, essas membranas acumulam radicais livres, sofrem oxidação, degeneração<sup>[7,9]</sup> e, conseqüentemente, deterioração anatômica das células de Purkinje do cerebelo, que são seus principais integradores dos circuitos neurais do cerebelo<sup>[6]</sup>. Assim sendo, atrofia cerebelar é algumas vezes observada em pacientes com AVED, como resultado da morte neuronal, mas nem sempre ela está presente. Mariotti et. al, em um estudo de 2004, reportou atrofia cerebelar em 45% dos pacientes italianos, enquanto que 55% apresentaram cerebelo íntegro<sup>[3]</sup>. A ataxia cerebelar se desenvolve em maior grau em decorrência da diminuição da conectividade neuronal evidenciada pela redução da arborização no cerebelo do que devido à atrofia cerebelar<sup>[6]</sup>. Apesar de ser principalmente expressa no fígado, a  $\alpha$ -TTP apresenta significativos níveis de expressão também no cérebro, placenta e útero, sugerindo que a proteína fornece proteção antioxidante a tecidos excepcionalmente vulneráveis. No cerebelo, esta proteína está aumentada em pacientes com doenças associadas a aumento do estresse oxidativo, tais como a doença de Alzheimer<sup>[10]</sup>. A concentração da  $\alpha$ -TTP varia dependendo da região do cérebro e sua expressão é regulada positivamente pelos níveis de estresse oxidativo e de vitamina E no sistema nervoso central, proporcionando uma regulação dinâmica e que favorece a manutenção da homeostase da vitamina E. Supõe-se que a  $\alpha$ -TTP possua alguma função no SNC que difere da função de transferência já bem estabelecida que esta proteína desempenha no fígado<sup>[6]</sup>.

Por meio da reciclagem do  $\alpha$ -tocoferol pela proteína  $\alpha$ -TTP que ocorre no fígado, a concentração da vitamina E é mantida constante no plasma, mesmo que sua ingestão diária pela dieta seja muito baixa, pois esta molécula será armazenada na gordura, reciclada e reutilizada diversas vezes. Se esta reciclagem está de alguma maneira prejudicada, o  $\alpha$ -tocoferol é logo eliminado do organismo, permitindo a degeneração das membranas plasmáticas pelos radicais livres e desenvolvimento de doenças como, por exemplo, a ataxia por deficiência de vitamina E (AVED).

## 1.4 Fisiopatologia da Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED)

As doenças neurodegenerativas são definidas pela perda progressiva de populações de células neuronais específicas e estão associadas a agregados proteicos. O estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na fisiopatologia dos distúrbios neurodegenerativos. Espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânions superóxido, hidroxirradicais e peróxido de hidrogênio, são naturalmente produzidas como resultado de reações celulares<sup>[11]</sup>.

Os ROS causam dano celular por meio de três mecanismos principais: peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e oxidação do DNA. Portanto, os antioxidantes possuem papel primordial na defesa celular contra os danos causados pelos ROS. Por ser o único antioxidante lipossolúvel nas membranas biológicas<sup>[11]</sup>, a vitamina E atua protegendo as membranas celulares dos danos oxidativos, neutralizando os efeitos dos radicais livres de oxigênio e peróxido<sup>[11]</sup>.

O sistema nervoso central é especialmente vulnerável aos danos provocados pelos radicais livres, pois apresenta alta taxa de consumo de oxigênio e abundante conteúdo lipídico. O dano oxidativo cumulativo ao longo do tempo explica o início tardio e a natureza lentamente progressiva de distúrbios neurodegenerativos<sup>[11]</sup>.

A ataxia por deficiência de vitamina E (AVED) ocorre devido a mutação em homozigose ou heterozigose composta em *TTPA* (chr8q13), codificante da enzima  $\alpha$ -TTP. É uma doença neurodegenerativa e progressiva, com idade de início geralmente entre 5 e 20 anos e herança autossômica recessiva. É mais comum no Mediterrâneo e Japão e caracteriza-se por níveis plasmáticos de vitamina E geralmente abaixo de 2 mg/L (ref. de 5 a 20 mg/L).

A deficiência de  $\alpha$ -TTP leva a acúmulo de radicais livres no SNC e à degradação das MP e degeneração de tecidos cerebelares, resultando na deterioração dos neurônios cerebelares e das vias proprioceptivas espinais. Danos cerebelares geralmente manifestam-se na forma de ataxia, que se caracteriza de forma geral por falta de coordenação nos movimentos voluntários (marcha, equilíbrio, fala).

A AVED geralmente se manifesta entre a infância e a adolescência e suas primeiras manifestações clínicas incluem ataxia progressiva apendicular (caracterizada pela presença de dismetria, disdiadococinesia e decomposição de movimentos) e axial (titubeação de cabeça, disartria e desequilíbrio durante a marcha), falta de coordenação com as mãos, perda de propriocepção e arreflexia. Outros sintomas e sinais que podem ser observados são tremores, presença dos sinais de Romberg e de Babinski positivos, diminuição da acuidade visual, oftalmoplegia, perda da sensibilidade vibratória e fraqueza muscular. A gravidade da doença varia imensamente entre portadores de diferentes variantes genéticas.

É uma das únicas formas de ataxia tratáveis. A reposição com altas doses diárias de vitamina E exógena compensa essa rápida eliminação, cessa a progressão da doença e reverte, ainda que de maneira limitada, alguns sintomas. O diagnóstico e início do tratamento com suplementação de altas doses diárias de vitamina E devem ser realizados precocemente, para que a progressão da doença cesse. A investigação de possíveis portadores de mutação bialélica no gene *TTPA* ainda assintomáticos também deve ser feita, pois o tratamento preventivo inibe o aparecimento dos sintomas.

A baixa concentração de vitamina E no plasma também é reportada em outras doenças associadas à capacidade prejudicada de absorção de lipídios no intestino, como é o caso de insuficiência pancreática, doença hepática colestática, abetalipoproteinemia, fibrose cística e doença de Crohn<sup>[12,13]</sup>. Nestas doenças, quadros atáxicos também podem estar presentes. Em pacientes com AVED, tanto a absorção de gordura e de vitamina E no intestino quanto sua incorporação em quilomícrons estão normais, mas a ineficiência na incorporação hepática do  $\alpha$ -tocoferol a VLDLs impede que a reciclagem da vitamina E plasmática seja eficiente, sendo assim imediatamente eliminada<sup>[3,9,13]</sup>. Em indivíduos normais, essa reciclagem atinge níveis em torno de  $1,4 \pm 0,6$  pools por dia<sup>[9]</sup>, e a concentração plasmática dessa vitamina é mantida constante mesmo que sua ingestão diária pela dieta seja muito baixa, pois esta molécula será armazenada na gordura, reciclada e reutilizada diversas vezes. Como em pacientes com AVED a homeostasia do  $\alpha$ -tocoferol está prejudicada, a suplementação diária de altas doses de vitamina E repõem a sua rápida eliminação, mantendo o pool de vitamina E plasmático e prevenindo a progressão da doença<sup>[7,9,12,13]</sup>. Assim sendo, o diagnóstico precoce da AVED e o início do tratamento com suplementação de altas doses diárias de vitamina E devem ocorrer

logo ao aparecimento dos primeiros sintomas para que a doença seja estabilizada e que ocorra, em alguns casos, a regressão de alguns sintomas. A investigação de possíveis portadores de mutação em bialélica no gene *TTPA*, quando há algum caso na irmandade, por exemplo, mesmo que ainda assintomáticos, também deve ser preconizado, pois o tratamento preventivo inibe o aparecimento dos sintomas e o paciente pode não desenvolver quadro clínico, tendo uma vida normal. O aconselhamento genético é, portanto, de fundamental importância para a qualidade de vida de pacientes com AVED e de sua família<sup>[2]</sup>.

Muitas vezes a AVED é confundida e erroneamente diagnosticada como ataxia de Friedreich (AF), a forma mais frequente de ataxia de herança recessiva, devido aos sintomas muito semelhantes.

O tipo de mutação parece estar diretamente relacionado ao quadro clínico apresentado pelo paciente<sup>[2]</sup> (Tabela 1). De forma geral, mutações dos tipos *frame shift* e *nonsense* estão associadas a formas mais graves, de início precoce e progressão rápida enquanto que mutações *missense* apresentam formas consideradas leves de início tardio e progressão lenta. Há, no entanto, exceções.

As mutações *frame shift* p.Glu249Asnfs\*15 (também descrita na literatura como c.744delA) e p.Thr172Leufs\*5 (descrita como c.513insTT) são as mais frequentemente relatadas. A mutação p.Glu249Asnfs\*15 é a mais prevalente no norte da África e na Itália<sup>[3]</sup>. Esta mutação altera o quadro de leitura e resulta na substituição dos últimos 30 aminoácidos por um peptídeo aberrante de 14 aminoácidos, codificando uma proteína não funcional<sup>[9]</sup>. Está associada a início precoce, entre três e 12 anos, e progressão rápida. A mutação *frame shift* p.Glu249Asnfs\*15, no éxon 3, que leva ao truncamento de mais de um terço da  $\alpha$ -tocoferol<sup>[9]</sup>, é mais comumente encontrada no norte da Europa e está associada a idade de início em torno dos 5 anos. É a segunda variante patogênica mais comum associada a AVED. Pacientes homocigotos para estas variantes, que levam à perda de função da  $\alpha$ -TTP, em geral necessitam de cadeira de rodas após alguns anos de progressão, desenvolvem disartria, sinal de Babinski, arreflexia de membros superiores e inferiores, escoliose, pés cavos, distúrbios de senso de vibração e atrofia cerebelar. Alguns pacientes podem desenvolver cardiomiopatias, retinopatias e titubeação de cabeça<sup>[3,14]</sup>.

A forma de AVED mais comum no Japão ocorre em decorrência da substituição c.303T→G, que promove a troca do aminoácido histidina no códon 101 por uma glutamina (p.His101Gln)<sup>[7]</sup>. Essa mutação está associada a uma forma leve e de progressão lenta da AVED, com os primeiros sintomas aparecendo após os 30 anos. Retinopatia, particularmente retinite pigmentosa (RP), está fortemente associada a esta variante, estando presente em cerca de 75% dos pacientes estudados<sup>[7]</sup>. A mutação p.His101Gln ainda consegue produzir uma proteína parcialmente funcional, em contraste com a variante p.Glu249Asnfs\*15, cujo produto perde totalmente sua função. Os pacientes japoneses apresentam níveis plasmáticos de vitamina E maiores do que os africanos e europeus ( $1,73 \pm 0,7$  mg/L e  $0,56 \pm 0,3$  mg/L, respectivamente).

Outras variantes patogênicas já descritas estão relacionadas na Tabela 2. A maioria das mutações *missense* está associada à forma leve de início tardio e progressão lenta. É interessante notar que pacientes heterozigotos compostos, em que um alelo está associado à forma grave e o outro alelo, à forma leve da doença apresentam um fenótipo intermediário<sup>[1,3,16]</sup>.

Indivíduos com mutação em heterozigose no gene *TTPA* e, portanto, apenas portadores e não afetados, podem desenvolver xantomas tendinosos, colesterol sérico elevado e níveis séricos de vitamina E um pouco abaixo do normal, consistentes com o estado heterozigótico, embora esta redução não seja capaz de causar danos ao sistema nervoso central<sup>[17]</sup>.

Percebe-se, portanto, que o tipo de mutação pode influenciar a idade de início, os sintomas e a progressão da ataxia, embora também possam ser modificados por fatores não genéticos, como a quantidade de vitamina E e lipídios na dieta diária. A medição da concentração plasmática de vitamina E deve ser incluída como parte das investigações em pacientes com ataxia progressiva, e, caso confirmada a deficiência dessa vitamina no plasma do paciente e excluindo-se doenças associadas à má absorção de gordura, recomenda-se o sequenciamento de *TTPA* para identificar o tipo de mutação. O sequenciamento desse gene é de grande importância no aconselhamento genético do paciente e de sua família, uma vez que há mutações cujo fenótipo é mais leve e outras que são mais graves, e essa informação auxilia no prognóstico da doença, apresentações clínicas e progressão<sup>[9]</sup>. De forma geral, as

mutações de *TTPA* que promovem a formação de proteína truncada estão associadas a uma forma grave da doença, enquanto algumas das mutações missense estão associadas a apresentações clínicas mais leves<sup>[3]</sup>. O tratamento precoce com vitamina E pode proteger esses pacientes contra danos neurológicos adicionais<sup>[13]</sup>.

**Tabela 2.** Correlação entre as mutações mais conhecidas da AVED e seus respectivos fenótipos

Mutação	ClinVar	Exon	Tipo	Vit E (mg/L)	Progressão	Idade de Início
p.Arg59Trp	65589	Exon 1	<i>Missense</i>	<0,5	Rápida	± 7 anos
p.His101Gln	9137	Exon 2	<i>Missense</i>	<2,0	Lenta	> 30 anos
p.Ala120Thr	65591	Exon 2	<i>Missense</i>	1,0	Lenta	± 20 anos
p.Arg134Ter	9141	Exon 3	<i>Nonsense</i>	<1,0	-	± 5 anos
p.Glu141Lys	65592	Exon 3	<i>Missense</i>	<1,5	Rápida	± 8 anos
p.Trp163fs	188951	Exon 3	<i>Frame shift</i>	<1,0	Rápida	± 7 anos
p.Thr172Leufs*5	9139	Exon 3	<i>Frame shift</i>	<2,0	Rápida	± 5 anos.
p.Lys177Serfs*3	65595	Exon 3	<i>Frame shift</i>	<1	Rápida	± 3 anos
p.Arg221Trp	65597	Exon 4	<i>Missense</i>	-	Lenta	± 10 anos
p.Glu249Asnfs*15	9136	Exon 5	<i>Frame shift</i>	<1,0	Rápida	De 8 a 15 anos
p.Arg134Ter	9141	Exon 3	<i>Nonsense</i>	<1,0	Rápida	± 5 anos

O diagnóstico de AVED é feito considerando-se a ataxia progressiva juntamente com a baixa concentração plasmática de vitamina E. Saber o tipo de mutação presente no paciente auxilia na determinação do prognóstico e no aconselhamento genético.

## 2. Objetivos

Os objetivos deste estudo, que inclui pacientes que apresentavam ataxia com deficiência de vitamina E (AVED), foram os de:

1. Investigar suas principais manifestações clínicas;
2. Determinar as suas bases moleculares e procurar realizar correlação genótipo-fenótipo;
3. Traçar um comparativo com a literatura atual;
4. Oferecer aconselhamento genético para os pacientes e suas famílias.

## 3. Justificativa

Não há publicações acerca da ataxia por deficiência de vitamina E no Brasil. O diagnóstico de pacientes com AVED é majoritariamente feito considerando-se a ataxia progressiva juntamente com a baixa concentração plasmática de vitamina E e excluindo-se defeitos na absorção intestinal de lipídios. O estudo genético não costuma ser realizado, o que torna o diagnóstico incompleto. Saber o tipo de mutação causadora da doença fornece informações sobre o prognóstico da doença e auxilia no aconselhamento genético. Ademais, estudos a nível molecular são de extrema importância tanto na pesquisa básica quanto na prática clínica. Não há dados estatísticos de prevalência sobre essa condição no Brasil, pois esta doença não é objeto de investigação nesta população. Não se tem conhecimento, portanto, nem a respeito das mutações mais prevalentes nos afetados deste país e nem sobre outras condições bioquímicas que possam estar ou não presentes nessa população.

Outros fatores, tais como alimentação ou modificadores genéticos, podem mudar o quadro clínico. Um estudo inicial sobre as principais mutações presentes no gene *TTPA* dos brasileiros, em associação com as principais manifestações clínicas, é imprescindível para uma

investigação inicial, servindo de base para futuras pesquisas sobre esta doença na população brasileira, aumentando o interesse e conhecimento médico e científico e, conseqüentemente, contribuindo para um diagnóstico mais preciso, contribuindo assim para uma melhor da qualidade de vida dos pacientes afetados por ataxia por deficiência de vitamina E.

## 4. Metodologia e Casuística

A coleta de dados foi feita no Ambulatório de Neurogenética do Hospital das Clínicas da FMUSP. As informações coletadas foram: idade de início (quando conhecido), progressão da doença e evolução após o início do tratamento. Para a avaliação funcional, foi utilizada a escala *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* (Escala para avaliação e classificação da ataxia - SARA), de uso corrente do Ambulatório de Neurogenética do HC-FMUSP.

A escala SARA (Material Complementar) é uma escala de pontuação de ataxia para 8 critérios, cada um para a qual se atribui um escore. Os critérios são os seguintes:

- 1) **Marcha:** é solicitado ao probando que caminhe alguns passos rente a uma parede, dê meia volta e ande em tandem, ou seja, com o calcanhar de um pé junto à ponta do outro pé. Atribui-se um escore de 0 (nenhuma dificuldade) a 8 (dificuldade máxima)
- 2) **Capacidade de permanecer em pé:** o probando deve permanecer em pé e descalço, com os pés juntos e em paralelo e, posteriormente, em tandem. Atribui-se pontuação de 0 (nenhuma dificuldade) a 6 (dificuldade máxima)
- 3) **Capacidade de permanecer sentado:** avalia-se a capacidade do probando de manter a postura na posição sentada. Pontua-se de 0 (nenhuma dificuldade) a 4 (dificuldade máxima)
- 4) **Dicção:** atribui-se pontuação entre 0 (pronúncia inalterada) até 6 (discurso ininteligível)



- 5) **Dismetria:** o examinador senta-se em frente ao probando e realiza 5 movimentos consecutivos rápidos e súbitos em direções imprevisíveis em um plano frontal, a cerca de 50% do alcance do examinado. Solicita-se ao probando seguir os movimentos com o seu dedo indicador, o mais rápido e precisamente possível. Atribui-se um escore de 0 (boa precisão) a 4 (nenhuma precisão)
- 6) **Tremor cinético:** é solicitado ao probando que aponte repetidamente, com o dedo indicador, do próprio nariz ao dedo do examinador, que está na frente do probando a cerca de 90% do alcance deste. É atribuída uma pontuação de 0 (sem tremor) a 4 (incapacidade de executar o exercício)
- 7) **Movimentos rápidos e repetitivos com as mãos:** solicita-se ao probando realizar 10 ciclos de movimentos alternados e repetitivos com as mãos o mais rápido e preciso possíveis. O escore de pontuação varia entre 0 (nenhuma dificuldade) a 4 (dificuldade máxima)
- 8) **Deslizar o pé pela perna:** o probando deita-se no leito e o examinador solicita que ele levante uma perna, aponte com o calcanhar para o joelho oposto, deslize pela canela até o tornozelo e repouse a perna na cama de exame. Este movimento deve ser realizado três vezes e com ambas as pernas, e uma pontuação de 0 (nenhuma dificuldade) a 4 (incapacidade de executar o movimento) é atribuída.

A soma de cada pontuação pode variar de 0 (nenhum comprometimento) a 40 (comprometimento máximo).

O DNA foi extraído de esfregaço oral ou de sangue periférico. A coleta do material foi realizada durante consulta no Ambulatório e a extração do DNA, no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL USP).

O material genético dos participantes foi sequenciado utilizando um kit de captura de éxons customizado por sondas, seguida por sequenciamento de nova geração (NGS) com Illumina HiSeq 4000. Para o alinhamento, foi utilizado o software Burrows-Wheeler Aligner (BWA); a identificação de variantes foi realizada utilizando software Genome Analysis Toolkit (GATK),

tendo como referência a versão GRCh37 do genoma humano. O painel utilizado inclui 287 genes associados a doenças genéticas tratáveis, entre eles o *TTPA*, e foi disponibilizado pela Mendelics Análise Genômica. As variantes identificadas foram confirmadas utilizando o software Integrative Genomics Viewer (IGV) e analisadas utilizando os softwares: gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) e ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Todos os pacientes ou seus responsáveis legais que participaram do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Material Complementar).

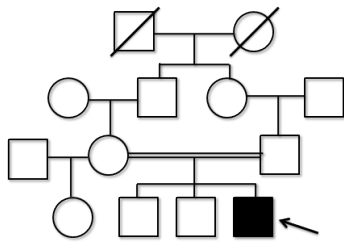
Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CEP-CONEP).

## 5. Resultados

Nove pacientes, entre estes dois irmãos gêmeos monozigóticos, de sete famílias aceitaram participar do estudo. A história clínica dos participantes está relatada a seguir:

### 5.1 Família A, paciente A1

O Paciente A1, com 26 anos de idade no momento do estudo, é o 3º filho de casal consanguíneo (primos em primeiro grau) e tem uma meia-irmã por parte de mãe. Não há casos semelhantes na família. O início do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos foi aos 6 anos de idade, afetando primeiramente a fala e a marcha, com tropeços freqüentes e desequilíbrio. A doença progrediu rapidamente e, aos 14 anos de idade, quando foi realizado o diagnóstico de AVED, já era dependente de cadeira de rodas para se deslocar a longas distâncias. Nesta época, os níveis plasmáticos de vitamina E eram de 0,6 mg/L (valor de referência: de 5,0 a 20,0 mg/L). A partir do início da suplementação com vitamina E, a doença parou de progredir.

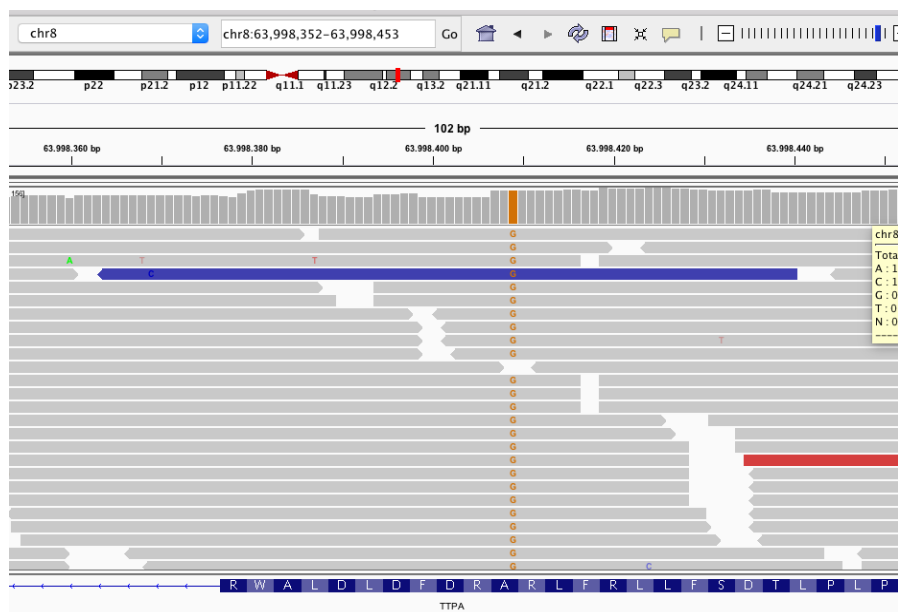


**Figura 5:** Heredograma da Família A com Paciente A1 em destaque.

Em consulta no Ambulatório de Neurogenética do HC-FMUSP foram observados disartria, hipotonia global, hiporreflexia, sinal de Romberg +, dismetria (<5cm) e tremor cerebelar bilateral (<2cm). O paciente negou disfagia ou disfonia. A estação com pés juntos foi possível, porém a estação e a marcha em tandem não. O paciente foi capaz de dar poucos passos com duplo apoio. Sua força, sensibilidade tátil e dolorosa estavam preservadas. Não apresentou nistagmo, porém sua mirada mostrou-se discretamente sacádica, mas sem alentecimento.

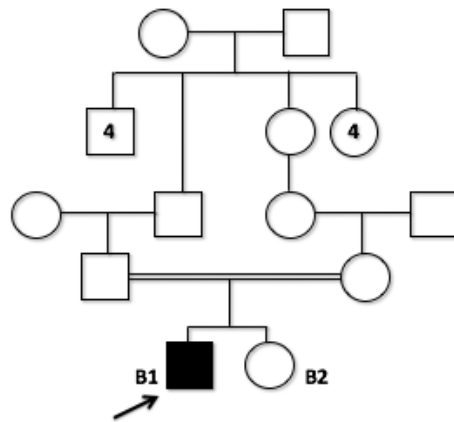
O paciente relata que, após o início da suplementação com vitamina E, notou uma melhora significativa em alguns sintomas e estabilização do quadro. Em 2015, o paciente apresentava distonia, que não foi observado na consulta de 2018. Relatou que, apesar de ainda estar presente, a disartria está significativamente melhor. A dosagem de vitamina E estava dentro dos padrões de normalidade: 12,0 mg/L. A escala SARA pontuou 20/40.

O estudo molecular do Paciente A1 identificou a mutação p.Ala58Pro em ambos os alelos, como observado na Figura 6:



**Figura 6:** Variante p.Ala58Pro identificada no Paciente A1, em homozigose, visualizada no Software IGV.

## 5.2 Família B, Paciente B1:



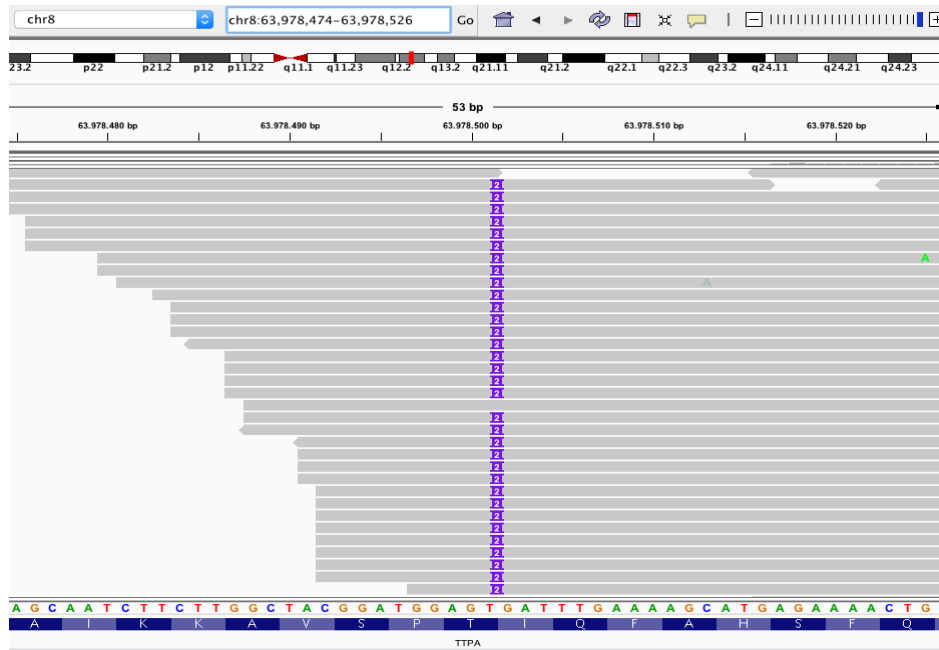
**Figura 7:** Heredograma da Família B, com Paciente B1 em destaque.

O Paciente B1, com 19 anos de idade no momento da avaliação, é filho de pais consanguíneos (primos em segundo grau). O quadro atáxico iniciou-se aos 11 anos de idade e o diagnóstico de AVED foi feito dois anos mais tarde, por meio da dosagem plasmática de vitamina E.

Durante consulta do Paciente B1 no Ambulatório de Neurogenética do HC-FMUSP, em 2018, foram observados escoliose, disartria, titubeação da cabeça, Romberg +, amiotrofia global, dismetria, decomposição de movimentos, desequilíbrio e hipopalestesia (diminuição da sensibilidade vibratória) no calcanhar. Oftalmoparesia ou alentecimento de mirada não foram observados, porém o paciente apresentou sacada hiperométrica. Apresentou marcha com base alargada, a estação com pés juntos foi possível, porém estação e marcha em tandem não. A dosagem da vitamina E estava dentro dos padrões da normalidade (13,6 mg/L) e a escala SARA pontuou 8/40.

Seis meses depois, porém, o paciente reportou leve piora no quadro. Passou a apresentar disfagia, piorou o desequilíbrio, a fala tornou-se mais ebriosa e o tremor e falta de coordenação durante movimentos voluntários ficaram mais evidentes. A escala SARA pontuou 11/40 e a concentração de vitamina E circulante estava consideravelmente abaixo do que na primeira consulta, porém ainda dentro dos limites da normalidade (8,2 mg/L).

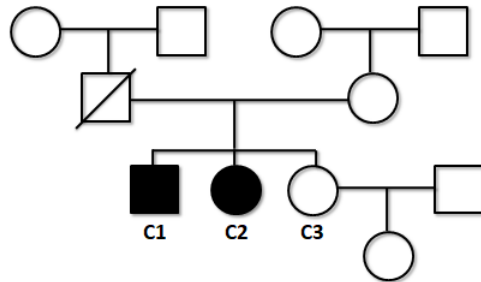
A investigação molecular apontou que o Paciente B1 é portador em homozigose da mutação p.Thr172Leufs\*5 (ClinVar: 9139), como mostra a Figura 8. A irmã mais nova de B1, 16 anos, também foi testada, mostrando que ela é portadora em heterozigose desta mesma variante.



**Figura 8:** Variante p.Thr172Leufs\*5 identificada no Paciente B1, em homozigose, visualizada no Software IGV.

### 5.3 Família C:

A Família C, proveniente de Seabra, não apresenta consangüinidade conhecida. Os dois filhos mais velhos, de uma prole de três, são sintomáticos:



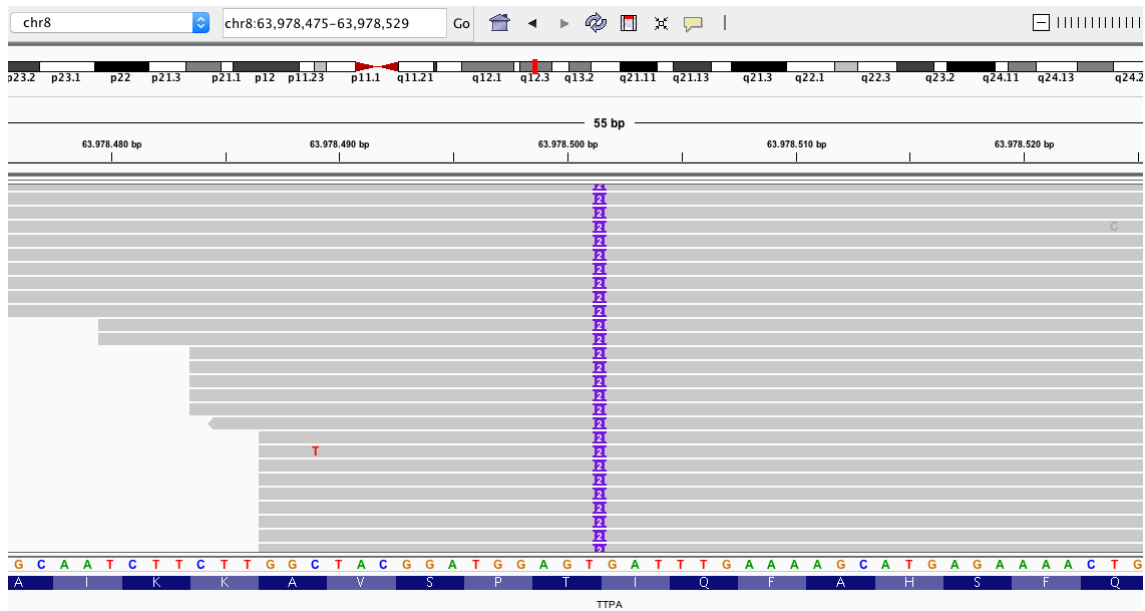
**Figura 9:** Heredograma da Família C.

#### 5.3.1 Paciente C1

O Paciente C1, primogênito de um casal não-consanguíneo e com 23 anos de idade no momento da avaliação, teve os primeiros sintomas aos 13 anos, apresentando andar cambaleante e quedas frequentes. O diagnóstico foi realizado um ano depois.

O Paciente C1 reporta que, a partir do início da suplementação com vitamina E, o quadro apresentou aparente estabilidade. Durante consulta no Ambulatório de Neurogenética do HC-FMUSP foi observada ataxia apendicular e axial, reflexos osteotendinosos (ROTs) hipoativos, discreta hipotonia global e disartria. O paciente C1 deambulava sem apoio, porém com dificuldade em degraus, e a mirada mostrou-se sem alteração. A dosagem de vitamina E encontrava-se dentro dos limites da normalidade: entre os anos de 2013 e 2018 variou entre 3,8 mg/L e 8,7 mg/L (valor de referência: de 5,0 a 20,0 mg/L). A Escala SARA pontuou 12/40.

A investigação molecular do Paciente C1 evidenciou a mutação p.Thr172Leufs\*5 (ClinVar: 9139) em ambos os alelos do gene TTPA.



**Figura 10:** Variante p.Thr172Leufs\*5 identificada no Paciente C1, em homozigose, visualizada no Software IGV.

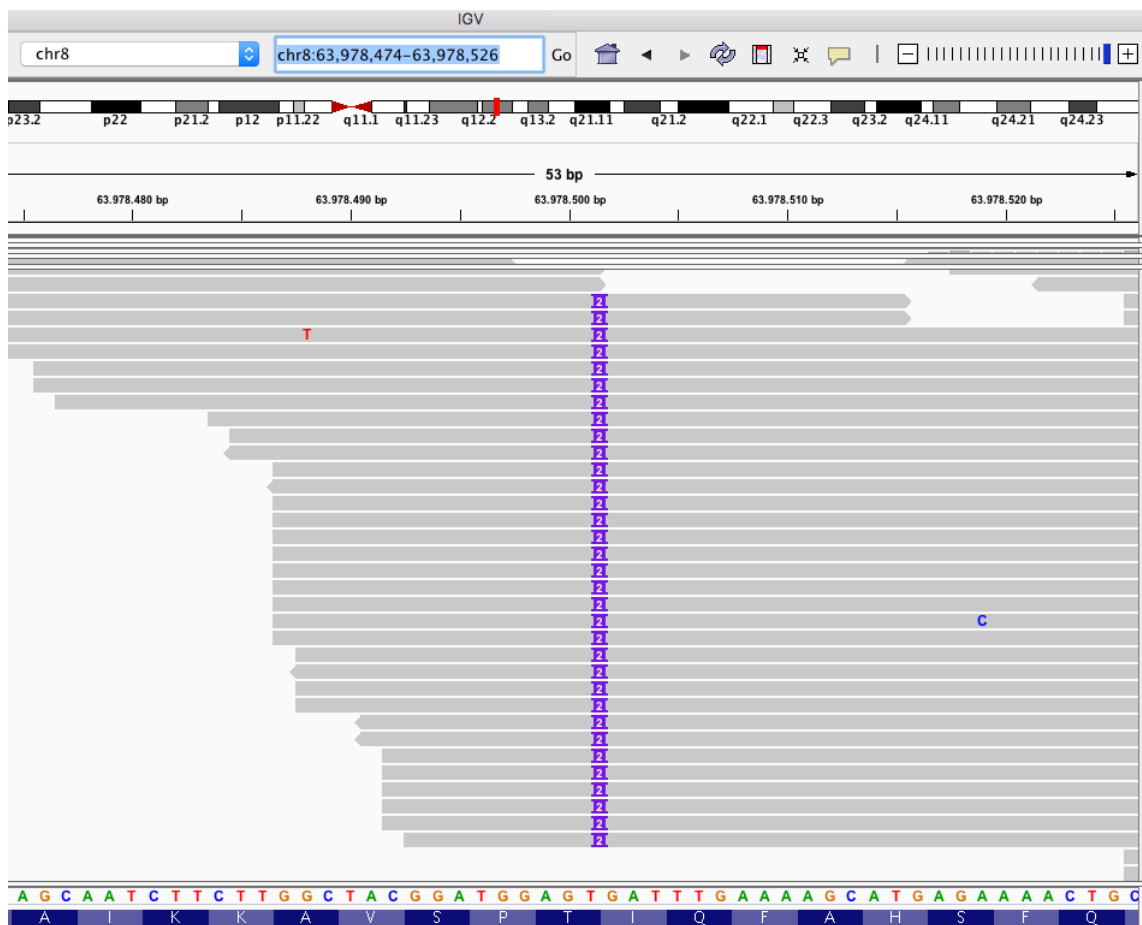
### 5.3.2. Paciente C2

A paciente C2, com 21 anos de idade no momento da avaliação e irmã do Paciente C1, apresentou os primeiros sintomas aos 9 anos de idade, com quedas frequentes e marcha atáxica. A partir dos 14 anos, quando foi feito o diagnóstico de AVED e implementada suplementação com vitamina E, a doença parou de progredir. Durante a consulta, ela apresentou ataxia axial e apendicular, hipotonia global, arreflexia, marcha ebriosa, desequilíbrio e distúrbios do movimento ocular. Não apresentou disartria, tremor cefálico e nem alterações da força muscular.

A dosagem plasmática de vitamina E variou de 1,1 mg/L a 22 mg/L entre 2010 e 2018 e a escala SARA pontuou 18/40.

Assim como seu irmão, a Paciente C2 é homozigota para a mutação p.Thr172Leufs\*5 (ClinVar: 9139), como mostra a figura 11:

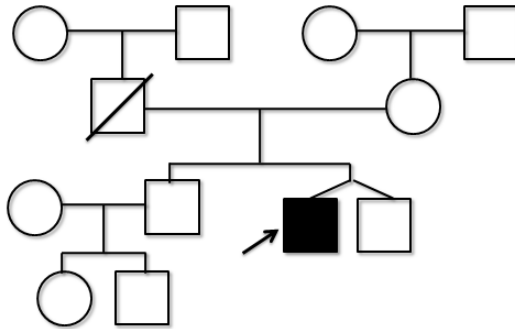




**Figura 11:** Variante p.Thr172Leufs\*5 identificada no Paciente C2, em homozigose, visualizada no Software IGV.

A filha mais nova da Família C, com 19 anos durante a consulta, assintomática, é heterozigota para esta mesma mutação.

#### 5.4. Família D, Paciente D1:



**Figura 12:** Heredograma da Família D com o Paciente D1 em destaque.

O Paciente D1, único membro afetado da família D e com 23 anos no momento da avaliação, é filho de pais não consangüíneos. Possui um irmão gêmeo bivitelino e outro irmão mais velho, ambos não afetados. Os primeiros sintomas clínicos de AVED em D1 manifestaram-se aos 14 anos de idade com desequilíbrio, falta de coordenação em movimentos voluntários e ataxia progressiva de marcha e presença do sinal de Romberg. O diagnóstico foi realizado aos 20 anos de idade, com dosagem de vitamina E de 0,5 mg/L (valor de referência: 5,0 a 20,0mg/L).

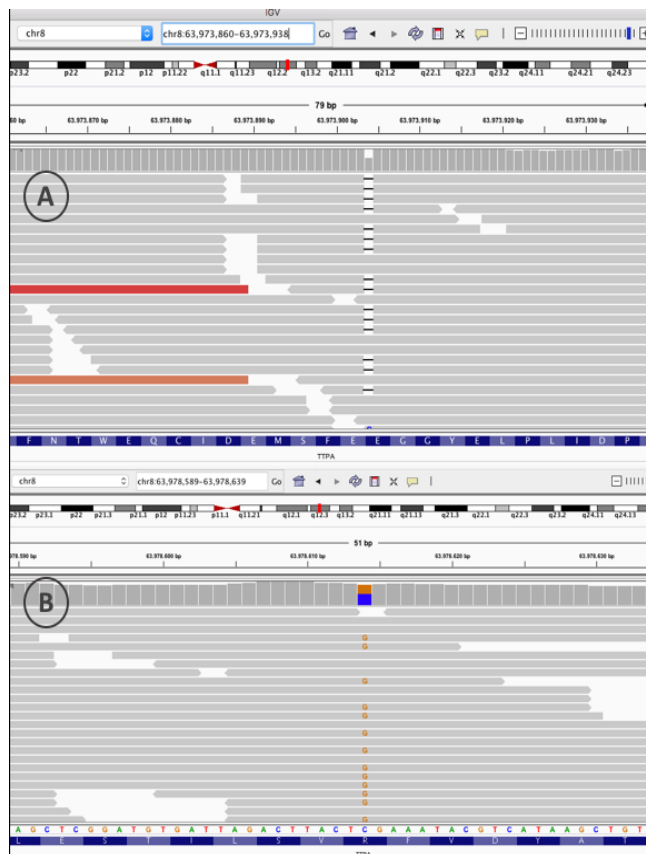
No exame clínico realizado em sua última consulta no Ambulatório de Neurogenética do HC-FMUSP, foram observados força grau V global (força normal), reflexos abolidos em membros inferiores e presentes em membros superiores, sinal de Babinski bilateral, pés cavos, dismetria, decomposição de movimentos, fala escandida, hipopalestesia (diminuição da sensibilidade vibratória) em MMSS e apalestesia em MMII, leve hipertonia e marcha atáxica (necessitando de duplo apoio de para caminhar).

O paciente relata estabilização do quadro clínico e melhora de alguns sintomas desde a introdução da suplementação com vitamina E. Em 2015, ano em que seus níveis plasmáticos de vitamina E atingiram o valor mais baixo desde que iniciou acompanhamento no HC-FMUSP (0,5 mg/L), apresentava sacadas hipométricas e, a partir de 2016 (vit. E= 4,6 mg/L), nenhuma alteração sacádica foi observada. A Escala SARA em 2017 pontuou 12/40 e, em 2018 a pontuação foi de 10/40, ou seja, houve melhora nos tremores e na coordenação na realização

de movimentos rápidos e alternados (disdiadococinesia). Já na consulta de 2019, o paciente D1 pontuou 11/40 na escala SARA, ou seja, apresentou discreta piora da estação.

Os níveis plasmáticos de vitamina E de D1 em 2018, ano em que a escala SARA atingiu a menor pontuação, estavam dentro da normalidade (18,1 mg/L), enquanto que, em 2019, após considerável queda na concentração desta vitamina (2,7 mg/L), o paciente apresentou discreta piora na pontuação da escala.

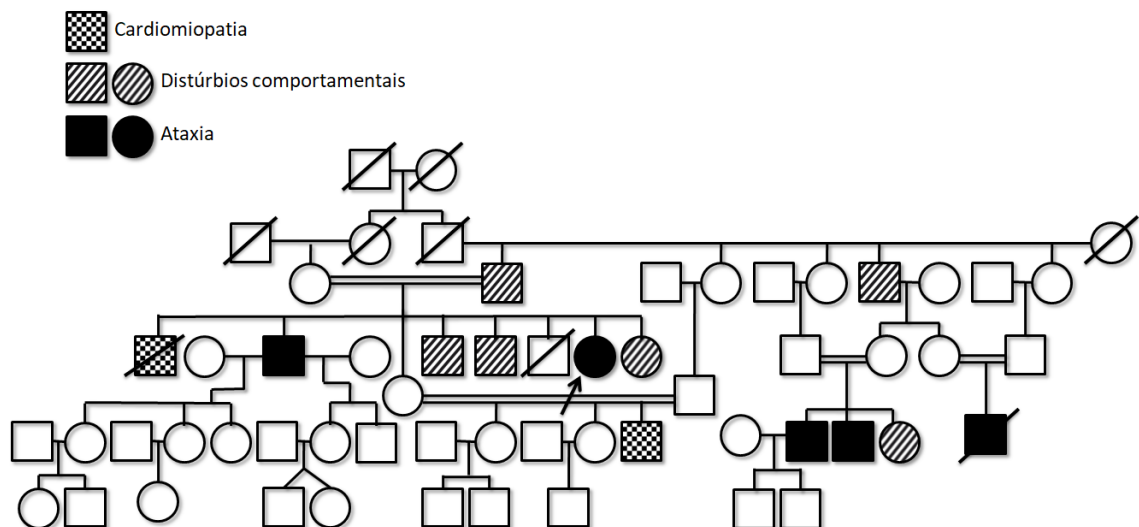
A Ressonância magnética de encéfalo mostrou-se normal. O exame molecular identificou duas variantes no gene TTPA: p.Glu249Asn fs\* 15 (ClinVar: 9136) e p.Arg134Pro, como mostra a Figura 13:



**Figura 13:** A) Variantes p.Glu249Asn fs\* 15 e B) p.Arg134Pro identificadas no Paciente D1, em heterozigose, visualizadas no Software IGV.

## 5.5 Família E, Paciente E1:

A Paciente E1, com 48 anos no momento da avaliação, é filha de pais primos em primeiro grau. Além dos genitores de E1, há outros casamentos consanguíneos na família com recorrência dos sintomas atáxicos na prole, inclusive na irmandade da paciente. O irmão mais velho, também acometido, atualmente está acamado e alimenta-se por sonda. Além da AVED, há casos de distúrbios comportamentais e cardiopatias na família.



**Figura 14:** Heredograma da Família E, com a Paciente D1 em destaque.

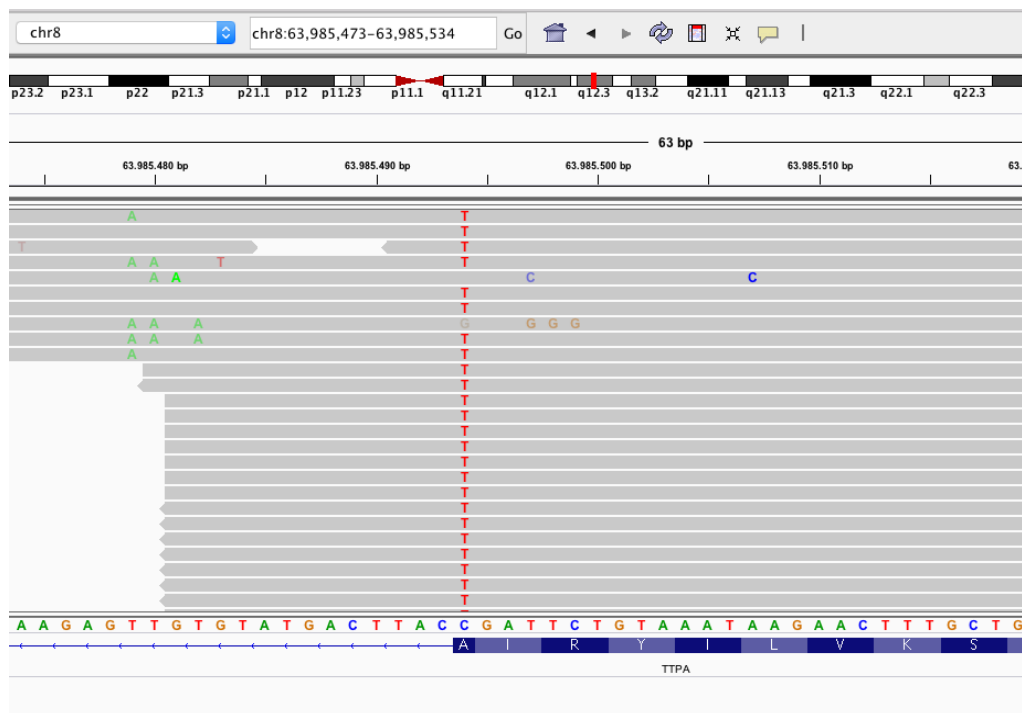
Os sintomas de E1 iniciaram-se aos 22 anos de idade, com tremor nos membros inferiores que, após 5 anos de progressão, acometeram também os membros superiores. Passou a apresentar desequilíbrio para deambular com piora no escuro. Após os 30 anos de idade, os sintomas progressivamente acometeram a cabeça (titubeação cefálica) e a fala, além de disfagia para alimentos sólidos. Aos 45 anos de idade necessitou de apoio unilateral devido à rigidez do membro inferior direito.

Em sua consulta no Ambulatório de Neurogenética do HC-FMUSP, em julho de 2018, foi observada discreta espasticidade e diminuição da força muscular (força grau IV) no membro inferior direito e força e tônus normais nos demais membros, importante tremor distônico com lateralização da cabeça para a esquerda (titubeação cefálica), discreta hipoestesia dolorosa no membro inferior direito, hipopalestesia importante em membros

superiores e inferiores, dismetria, marcha atáxica com apoio unilateral, sinal de Romberg + e importante disartria. Não foram observadas alterações do movimento ocular e nem hipo ou arreflexia. O valor sérico de vitamina E da paciente estava em 1,2 mg/L e a escala SARA pontuou 17/40.

O diagnóstico de AVED e início da suplementação com vitamina E foi feito em 2018, quando a paciente já estava com 48 anos de idade. Assim, a Paciente E ficou quase 26 anos sem tratamento enquanto a doença progredia lentamente.

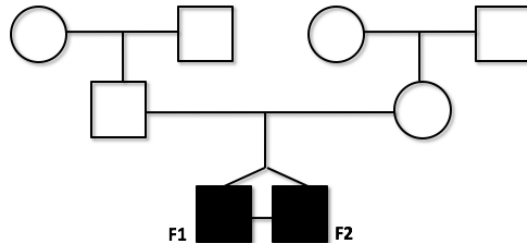
A investigação molecular apontou que a Paciente E1 é homozigota para a mutação p.Ala120Thr (ClinVar: 65591), como mostra a imagem a seguir:



**Figura 15:** Variante p.Ala120Thr identificada no Paciente E1, em homozigose, visualizada no Software IGV.

## 5.6. Família F, Pacientes F1 e F2:

Os irmãos F1 e F2 são gêmeos monozigóticos e únicos filhos de casal não consanguíneo.



**Figura 16:** Heredograma da Família F.

Com 23 anos à época da avaliação, os Pacientes F1 e F2 relataram em consulta que desde a infância apresentavam desequilíbrio e que, a partir dos 10 anos de idade, iniciou o quadro de quedas. Evoluíram com falta de coordenação nos movimentos voluntários. O diagnóstico e início da reposição de vitamina E foi feito aos 14 anos de idade quando o exame bioquímico evidenciou deficiência de vitamina E (0,1 mg/L) e o quadro mantém-se constante desde então.

Durante consulta no Ambulatório de Neurogenética do HC-FMUSP em 2018 foi observada discreta ataxia axial e apendicular, marcha com base alargada, dificuldade para manter tandem e discreta escoliose em ambos. Os reflexos e a força permaneciam inalterados. Os níveis séricos de vitamina E estavam dentro dos valores considerados normais (Paciente F1: 10,5 mg/L; Paciente F2: 8,0 mg/L) e a escala SARA pontuou 8/40 para o Paciente F1 e 7/40 para o seu irmão.

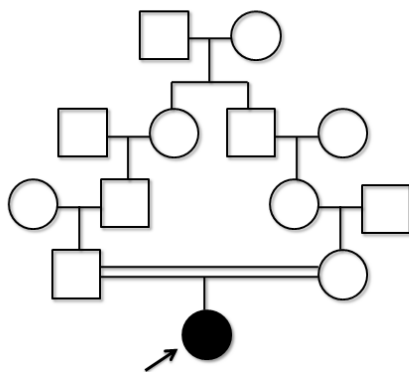
Uma vez que os Pacientes F1 e F2 são gêmeos monozigóticos e presume-se que seus genomas sejam idênticos, apenas no Paciente F1 foi realizado o sequenciamento de *TTPA*. Foram identificadas duas variantes: p.Glu249Asnfs\*15 (ClinVar: 9136) e p.Thr172Leufs\*5 (ClinVar: 9139):



**Figura 17:** A) Variantes p.Glu249Asnfs\*15 e B) p.Thr172Leufs\*5 identificadas no Paciente F1, em heterozigose, visualizadas no Software IGV.

## 5.8 Família G, Paciente G1:

A Paciente G1, 30 anos de idade no momento da avaliação, é filha única de casal consanguíneo (primos em segundo grau). O diagnóstico de AVED foi realizado quando a paciente estava com 21 anos de idade e a dosagem de vitamina E mostrou-se deficiente (2,4 mg/L). A partir da suplementação com vitamina E, o quadro parou de progredir.



**Figura 18:** Heredograma da Família G, com a Paciente G1 em destaque.

Durante avaliação no Ambulatório de Neurogenética do HC-FMUSP, foram observados ataxia cerebelar, hipoestesia profunda, arreflexia global, dismetria, decomposição de movimentos, Babinski bilateral, disartria e desequilíbrio. Sua força permanecia inalterada (força grau V global) e não havia alteração nos movimentos oculares. A escala SARA pontuou 11/40. Desde os 24 anos de idade a paciente é dependente de cadeira de rodas para locomover-se a longas distâncias; já para distâncias curtas, deambula com dificuldade e necessita de duplo apoio.

Relata que a fala e a propriocepção melhoraram com a reposição de vitamina E. Em 2011, a Paciente apresentava nistagmo e disfagia, o que não foram observados na consulta de 2018. A investigação molecular do gene TTPA da Paciente G1 identificou a mutação p.Glu249Asn fs\*15 (ClinVar: 9136) em homozigose:

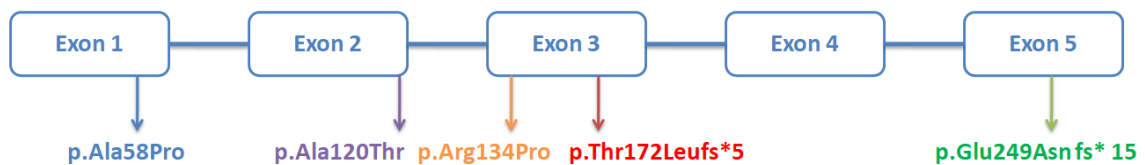




**Figura 19:** Variante p.Glu249Asn fs\*15 identificada no Paciente G1, em homozigose, visualizada no Software IGV.

## 6. Discussão

Das sete famílias investigadas, quatro (57%) apresentavam consangüinidade, o que é esperado para uma condição autossômica recessiva rara. Cinco variantes foram identificadas (Figuras 20, 21 e 22):



**Figura 20:** Representação do gene TPA e as variantes identificadas.

Paciente	Alelo 1	Alelo 2	SARA	Idade de início	Tempo até diagnóstico	Consang.
Paciente A1	p.Ala58Pro	p.Ala58Pro	20/40	6 anos	8 anos	Sim
Paciente B1	p.Thr172Leufs*5	p.Thr172Leufs*5	11/40	11 anos	2 anos	Sim
Paciente C1	p.Thr172Leufs*5	p.Thr172Leufs*5	12/40	13 anos	1 ano	Não
Paciente C2	p.Thr172Leufs*5	p.Thr172Leufs*5	18/40	9 anos	5 anos	Não
Paciente D1	p.Glu249Asn fs* 15	p.Arg134Pro	11/40	14 anos	6 anos	Não
Paciente E1	p.Ala120Thr	p.Ala120Thr	17/40	22 anos	26 anos	Sim
Paciente F1	p.Glu249Asn fs* 15	p.Thr172Leufs*5	8/40	<10 anos	± 4 anos	Não
Paciente F2	p.Glu249Asn fs* 15	p.Thr172Leufs*5	7/40	<10 anos	± 4 anos	Não
Paciente G1	p.Glu249Asn fs* 15	p.Glu249Asn fs* 15	11/40	18 anos	3 anos	Sim

**Figura 21:** Variantes identificadas, idade de início dos sintomas, tempo transcorrido até o diagnóstico e pontuação na escala de gravidade SARA:

Posição (Hg 19)	DNA codificante	Consequência	ClinVar	Frequencia
chr8:63998409C>G	c.172G>C	p.Ala58Pro	-	0
chr8:63978501T>TAA	c.513_514insTT	p.Thr172Leufs*5	9139	0.0001450
chr8:63973904delT	c.744delA	p.Glu249Asn fs*15	9136	0.00006366
chr8:63978614C>G	c.401G>C	p.Arg134Pro	-	0.000003980
chr8:63985494C>T	c.358G>A	p.Ala120Thr	65591	0.00003892

**Figura 22:** Posição genômica (Hg 19), posição de acordo com o DNA codificante, efeito sobre a proteína, ClinVar da variante (quando existente) e frequência alélica (GnomAD):

A variante mais prevalente na população estudada foi a *frameshift* Thr172Leufs\*5 (Chr8:63,978,501T>TAA, c.513\_514insTT - ENST00000260116, também descrita apenas como 513insTT), estando presente em homozigose em três pacientes testados (Pacientes B1, C1 e C2), e em heterozigose composta em outros dois pacientes (os irmãos gêmeos homozigóticos F1 e F2). É a variante mais prevalente no mundo, estando presente e em heterozigose em 41 entre cerca de 282.676 alelos investigados (frequência: 0.0001450). Esta mutação já foi inúmeras vezes descrita na literatura médica<sup>[3,14,15,18,19]</sup>, sendo responsável pela forma grave da doença e foi mais frequentemente observada em pacientes norte-africanos e italianos.

Em quase todos os relatos da literatura, os pacientes homozigotos iniciaram quadro atáxico antes dos 10 anos de idade. A idade de início dos sintomas nos pacientes homozigotos para a mutação Thr172Leufs\*5 no presente estudo variou entre 9 e 13 anos de idade. Entre estes, a Paciente C2, cuja idade de início dos sintomas foi a mais precoce (9 anos de idade) e tempo transcorrido até o diagnóstico foi o mais longo (5 anos de progressão), apresentou o fenótipo mais grave (a escala SARA pontuou 18/40) entre os pacientes homozigotos para esta variante. Seu irmão, o Paciente C1, iniciou o quadro atáxico aos 13 anos de idade e o diagnóstico ocorreu apenas 1 ano mais tarde. Assim sendo, este paciente apresentou escore SARA menor do que sua irmã, pontuando 12/40. O tempo de progressão da doença até o diagnóstico e, conseqüentemente, início do tratamento com suplementação de vitamina E corroborou a importância do diagnóstico precoce, evidenciado através do fenótipo menos grave do Paciente C1 em relação a sua irmã. O terceiro probando homozigoto para esta

mesma variante, o Paciente B1, iniciou os sintomas aos 11 anos de idade e, após 2 anos de progressão, a escala SARA pontuou 11/40, sugerindo que outros fatores possam estar associados às manifestações clínicas, como por exemplo alimentação e/ou modificadores genéticos, uma vez que se esperava fenótipo sutilmente mais grave em comparação ao Paciente C1, que apresentou quadro mais tardiamente e a doença progrediu sem tratamento por mais tempo.

A variante *frame shift* p.Glu249Asnfs\*15 (chr8:63973904delT, c.744delA - ENST00000260116, descrita na literatura apenas como 744delA), foi a segunda mutação mais frequentemente identificada entre os pacientes analisados. Ela se encontra presente, sempre em heterozigose, em 16 entre 251.338 alelos investigados mundialmente (frequência de 0.00006366). Esta variante já foi descrita na literatura<sup>[3,14,15]</sup> associada a um fenótipo grave da doença, com idade de início do aparecimento dos sintomas geralmente entre 8 e 13 anos<sup>[3,14]</sup>. Entre os pacientes investigados no presente estudo, apenas uma apresentava esta mutação em ambos os alelos (Paciente G1), enquanto que outros três portavam esta alteração concomitantemente com outra variante, presumivelmente em heterozigose composta (Pacientes D1, F1 e F2). A Paciente G1 iniciou o quadro clínico apenas aos 21 anos de idade, sugerindo que outros fatores estejam atuando nas manifestações fenotípicas (como por exemplo alimentação e/ou modificadores genéticos). A progressão da doença neste probando, no entanto, ocorreu de maneira rápida,

Os participantes heterozigotos para as mutações p.Glu249Asnfs\*15 e Thr172Leufs\*5 (os irmãos gêmeos monozigóticos F1 e F2) apresentaram início do quadro clínico antes dos 10 anos de idade, em concordância o que é descrito na literatura<sup>[14]</sup>, cuja idade de início variou entre os 8 e 11 anos de idade. Após cerca de 4 anos de progressão sem tratamento, os pacientes obtiveram pontuação SARA entre 7 e 8, sendo os probandos menos afetados neste grupo amostral, embora sejam portadores de duas mutações associadas à progressão rápida.

A mutação *missense* p.Ala120Thr (c.358G>A, Chr8:63985494C>T - ENST00000260116), identificada em apenas uma paciente (Paciente E1) e em ambos os alelos, foi descrita na literatura<sup>[14]</sup>, como responsável pela forma leve da doença. Ela foi identificada em 11 entre cerca de 282.596 alelos investigados mundialmente (frequência de 0.00003892). O único paciente homozigoto para esta mutação descrito na literatura era de origem belga e iniciou o

quadro clínico aos 21 anos de idade, apresentando progressão lenta do quadro. Na época do diagnóstico, os níveis séricos de vitamina E neste paciente estavam em 1,0 mg/L. A Participante investigada no presente estudo que apresentava o mesmo genótipo (Paciente E1), apresentou os primeiros sintomas aos 22 anos de idade e os níveis plasmáticos de vitamina E no momento do diagnóstico eram de 1,2 mg/L. A progressão da doença na Paciente E1 também foi lenta, uma vez que o diagnóstico desta participante foi realizado tardiamente e a paciente ainda apresentava um quadro intermediário (SARA de 17/40) após 26 anos de progressão.

As variantes p.Arg134Pro e p.Ala58Pro, identificadas em dois pacientes, nunca foram previamente descritas na literatura.

A variante p.Arg134Pro é bastante rara, sendo identificada em heterozigose em apenas 1 entre cerca de 250 mil alelos da população mundial (0.000003980), e não foi previamente descrita na literatura. A arginina na posição 134 é altamente conservada nas diversas espécies biológicas e programas computacionais de predição “in silico” de patogenicidade sugerem que sua substituição por prolina seja potencialmente deletéria. Por estar presente no Paciente D1 em heterozigose com uma mutação sabidamente patogênica (p.Glu249Asnfs\*15), considerando o quadro clínico e bioquímico bastante típico, a conservação do aminoácido e a sua baixa frequência na população, esta variante foi considerada como provavelmente patogênica. A escala SARA deste probando atingiu escore de 11/40 após 6 anos de progressão da doença até o diagnóstico.

A variante p.Ala58Pro é bastante rara, não sendo identificada em nenhum entre cerca de 130 mil indivíduos da população mundial. A alanina na posição 58 é consideravelmente conservada nas diversas espécies biológicas e programas computacionais de predição “in silico” de patogenicidade sugerem que esta substituição seja potencialmente deletéria. Ademais, uma vez que a idade de início dos sintomas do único paciente homozigoto para esta alteração (Paciente A1) foi muito precoce (6 anos) e a progressão consideravelmente rápida (atualmente, o paciente é cadeirante e a escala SARA pontuou 20/40, a mais alta do grupo amostral estudado), supõe-se que, embora esta mutação seja do tipo *missense*, ela parece contribuir para um fenótipo bastante grave da doença.

## 7. Conclusões

Na investigação de 7 famílias com 9 indivíduos afetados por AVED, foi possível concluir que:

1. O quadro clínico foi caracterizado por ataxia com componente sensitivo e cerebelar, de início até os 22 anos de idade. Consanguinidade estava presente em 4 das sete famílias e o grau de incapacidade, medido pela escala SARA, foi de leve a moderado. O tempo transcorrido entre o início dos sintomas e o diagnóstico variou de 1 até 26 anos. A suplementação oral com altas doses de vitamina E permitiu uma estabilização dos sintomas
2. Identificou-se variantes bialélicas em todos os 9 pacientes (incluindo um par de gêmeos homocigóticos). Três destas mutações já foram previamente publicadas: a variante p.Thr172Leufs\*5, que estava presente em 8 alelos (sendo que em homocigose em 3 indivíduos), a p.Glu249Asnfs\*15, identificada em 5 alelos (em homocigose em um paciente) e a Ala120Thr, que se encontrava em homocigose em uma paciente. Duas variantes nunca foram previamente reportadas: p.Ala58Pro, presente em homocigose e a p.Arg134Pro, que se encontrava em heterocigose.
3. Seis entre os 9 pacientes tinham mutações bialélicas em TTPA que levavam a um *frame shift*, um era heterocigoto com uma mutação do tipo *frame shift* e outra *missense* e dois tinham mutação do tipo *missense* em homocigose.
4. Não foi possível determinar uma correlação clara entre o genótipo e o fenótipo. A idade de início de indivíduos com variantes bialélicas de perda de função da proteína variou entre cerca de 9 e 20 anos. Apenas a paciente com a variante *missense* p.Ala120Thr em homocigose mostrou ter a uma apresentação mais branda da doença, com início dos sintomas aos 22 anos e progressão lenta. O paciente com a variante p.Ala58Pro teve início bastante precoce e progressão rápida, sugerindo que ela tem repercussão funcional significativa.

5. Todos os indivíduos e suas famílias que participaram deste estudo receberam aconselhamento genético.

## 8. Referências Bibliográficas:

- [1] Schuelke, M., et al. "Ataxia with vitamin E deficiency: biochemical effects of malcompliance with vitamin E therapy." *Neurology* 55.10 (2000): 1584-1586.
- [2] Bonello, Michael, and Partha Ray. "A Case of Ataxia with Isolated Vitamin E Deficiency Initially Diagnosed as Friedreich's Ataxia." *Case reports in neurological medicine* 2016 (2016).
- [3] Mariotti, C., et al. "Ataxia with isolated vitamin E deficiency: neurological phenotype, clinical follow-up and novel mutations in TTPA gene in Italian families." *Neurological sciences* 25.3 (2004): 130-137.
- [4] Akbar, Umar, and Tetsuo Ashizawa. "Ataxia." *Neurologic clinics* 33.1 (2015): 225-248.
- [5] Adam, M. P., et al. "Friedreich Ataxia--GeneReviews®."
- [6] Ulatowski, Lynn M., and Danny Manor. "Vitamin E and neurodegeneration." *Neurobiology of disease* 84 (2015): 78-83.
- [7] Yokota, Takanori, et al. "Friedreich-like ataxia with retinitis pigmentosa caused by the His101Gln mutation of the  $\alpha$ -tocopherol transfer protein gene." *Annals of neurology* 41.6 (1997): 826-832.
- [8] Sokol, Ronald J. "Vitamin E and neurologic function in man." *Free Radical Biology and Medicine* 6.2 (1989): 189-207.
- [9] Ouahchi, Karim, et al. "Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the  $\alpha$ -tocopherol transfer protein." *Nature genetics* 9.2 (1995): 141.
- [10] Copp, Richard P., et al. "Localization of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders." *Brain research* 822.1-2 (1999): 80-87.
- [11] Ricciarelli, Roberta, et al. "Vitamin E and neurodegenerative diseases." *Molecular aspects of medicine* 28.5-6 (2007): 591-606.



[12] Gordon, Neil. "Hereditary vitamin-E deficiency." *Developmental medicine and child neurology* 43.2 (2001): 133-135.

[13] Alex, G., M. R. Oliver, and K. J. Collins. "Ataxia with isolated vitamin E deficiency: a clinical, biochemical and genetic diagnosis." *Journal of paediatrics and child health* 36.5 (2000): 515-516.

[14] Cavalier, Laurent, et al. "Ataxia with isolated vitamin E deficiency: heterogeneity of mutations and phenotypic variability in a large number of families." *The American Journal of Human Genetics* 62.2 (1998): 301-310.

[15] Di Donato, I., S. Bianchi, and A. Federico. "Ataxia with vitamin E deficiency: update of molecular diagnosis." *Neurological sciences* 31.4 (2010): 511-515.

[16] Sokol, Ronald J., et al. "Isolated vitamin E deficiency in the absence of fat malabsorption—familial and sporadic cases: characterization and investigation of causes." *The Journal of laboratory and clinical medicine* 111.5 (1988): 543-547.

[17] Harding, A. E., et al. "Spinocerebellar degeneration associated with a selective defect of vitamin E absorption." *New England Journal of Medicine* 313.1 (1985): 32-35.

[18] Angelini, Lucia, et al. "Myoclonic dystonia as unique presentation of isolated vitamin E deficiency in a young patient." *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 17.3 (2002): 612-614.

[19] Hentati, Afif, et al. "Human  $\alpha$ -tocopherol transfer protein: Gene structure and mutations in familial vitamin E deficiency." *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 39.3 (1996): 295-300.

[20] Benomar, Ali, et al. "Clinical comparison between AVED patients with 744 del A mutation and Friedreich ataxia with GAA expansion in 15 Moroccan families." *Journal of the neurological sciences* 198.1-2 (2002): 25-29.

[21] Herbas, Maria S., et al. " $\alpha$ -Tocopherol transfer protein inhibition is effective in the prevention of cerebral malaria in mice." *The American journal of clinical nutrition* 91.1 (2009): 200-207.

[22] Herbas, Maria S., et al. "Alpha-tocopherol transfer protein disruption confers resistance to malarial infection in mice." *Malaria journal* 9.1 (2010): 101.

# 9. Material Complementar

## 9.1 Escala para avaliação e graduação de ataxia (SARA)

### 1) Marcha

O paciente é solicitado (1) a andar em uma distância segura paralela a uma parede e dar uma meia-volta (meia volta para direção oposta da marcha) e (2) andar pé-ante-pé sem apoio.

0 Normal, sem dificuldade para andar, virar-se ou andar na posição pé-ante-pé (até um erro aceito)

1 Discretas dificuldades, somente visíveis quando anda 10 passos consecutivos na posição pé-ante-pé

2 Claramente anormal, marcha na posição pé-ante-pé impossível com 10 ou mais passos

3 Consideravelmente cambaleante, dificuldades na meia-volta, mas ainda sem apoio

4 Marcadamente cambaleante, necessitando de apoio intermitente da parede

5 Gravemente cambaleante, apoio permanente com uma bengala ou apoio leve de um braço

6 Marcha > 10 m somente possível com apoio forte (2 bengalas especiais ou um andador ou um acompanhante)

7 Marcha < 10 m somente possível com apoio forte (2 bengalas especiais ou um andador ou um acompanhante)

8 Incapaz de andar mesmo com apoio

Pontuação:

## **2) Postura**

O paciente é solicitado a permanecer (1) na posição natural, (2) com os pés juntos e em paralelo (dedões juntos) e (3) em pé-ante-pé (ambos os pés em uma linha, sem espaço entre os tornozelos e os dedos). Deve-se retirar os sapatos e olhos permanecerem abertos. Para cada condição, três tentativas são permitidas. A melhor resposta é considerada.

0 Normal, consegue permanecer em pé na posição pé-ante-pé por > 10 s

1 Capaz de permanecer em pé com os pés juntos sem desvios, mas não na posição de pé-ante-pé por >10 s

2 Capaz de permanecer em pé com os pés juntos por >10 s, mas somente com desvios

3 Capaz de permanecer em pé por > 10 s sem apoio na posição natural, mas não com os pés juntos

4 Capaz de permanecer em pé por > 10 s na posição natural somente com apoio intermitente

5 Capaz de permanecer em pé por >10 s na posição natural somente com apoio constante de um braço

6 Incapaz de permanecer em pé por > 10 s mesmo com apoio constante de um braço

Pontuação:

## **3) Sentar**

O paciente é solicitado a sentar na cama de exame sem apoio dos pés, olhos abertos e braços esticados na frente.

0 Normal, sem dificuldades em sentar > 10 s

1 Discretas dificuldades, desvios leves

2 Desvios constantes, mas capaz de sentar > 10 s sem apoio

3 Capaz de sentar > 10 s somente com apoio intermitente

4 Incapaz de sentar > 10 s sem um apoio constante

Pontuação:

#### **4) Distúrbios da fala**

A fala é avaliada durante uma conversação normal

0 Normal

1 Sugestivo de alteração na fala

2 Alteração na fala, mas fácil de entender

3 Ocasionalmente palavras difíceis de entender

4 Muitas palavras difíceis de entender

5 Somente palavras isoladas compreensíveis

6 Fala ininteligível / anartria

Pontuação:

#### **5) Teste de perseguição do dedo**

Cada lado avaliado isoladamente

O paciente permanece confortavelmente sentado. Se necessário, é permitido o apoio dos pés e do tronco. O examinador senta em frente do paciente e realiza 5 movimentos consecutivos inesperados e rápidos de apontar em um plano frontal, a mais ou menos 50% do alcance do paciente. Os movimentos deverão ter uma

amplitude de 30 cm e uma frequência de 1 movimento a cada 2 segundos. O paciente é solicitado a seguir os movimentos com o índice, o mais preciso e rápido possível. É considerada a execução dos 3 últimos movimentos.

0 Ausência de dismetria

1 Dismetria, não atingir ou ultrapassar o alvo < 5 cm

2 Dismetria, não atingir ou ultrapassar o alvo < 15 cm 3 Dismetria, não atingir ou ultrapassar o alvo > 15 cm

4 Incapaz de realizar os 5 movimentos

Pontuação direito: Pontuação esquerdo:

Média dos dois lados  $(D + E / 2)$ :

## **6) Teste index-nariz**

Cada lado avaliado isoladamente

O paciente permanece confortavelmente sentado. Se necessário, é permitido o apoio dos pés e do tronco. É solicitado que o paciente aponte repetidamente seu índice em seu nariz para o dedo do examinador, que está a cerca de 90% do alcance do paciente. Os movimentos são realizados a uma velocidade moderada. A execução do movimento é graduada de acordo com a amplitude do tremor de ação.

0 Ausência de tremor

1 Tremor com uma amplitude < 2 cm

2 Tremor com uma amplitude < 5 cm

3 Tremor com uma amplitude > 5 cm 4 Incapaz de realizar os 5 movimentos

Pontuação direito: Pontuação esquerdo:

Média dos dois lados (D + E /2):

### **7) Movimentos alternados e rápidos das mãos**

Cada lado avaliado isoladamente

O paciente deve permanecer confortavelmente sentado. Se necessário, é permitido o apoio dos pés e do tronco. É solicitado que o paciente realize 10 ciclos com alternância pronação e supinação em suas coxas o mais rápido e preciso possível. O movimento é demonstrado ao paciente há aproximadamente 10 ciclos em 7 segundos. O tempo exato para execução do movimento deverá ser obtido.

0 Normal, sem irregularidades (realiza <10s)

1 Discretamente irregular (realiza <10s)

2 Claramente irregular, difícil de distinguir movimentos individuais ou interrupções relevantes, mas realiza <10 s

3 Muito irregular, difícil de distinguir movimentos individuais ou interrupções relevantes, realiza >10s

4 Incapaz de completar 10 ciclos

Pontuação direito: Pontuação esquerdo:

Média dos dois lados (D + E /2):

## 8) Manobra calcanhar-joelho

Cada lado avaliado isoladamente

O paciente deita na cama de exame, sem conseguir visualizar suas pernas. É solicitado que

levante uma perna, aponte com o calcanhar no outro joelho, deslize pela tíbia até o tornozelo e retorne a perna em repouso na cama. A tarefa é realizada 3 vezes. O movimento de deslizamento deverá ser feito em 1 s. Se o paciente deslizar sem o contato com a tíbia em todas as três tentativas, gradue como 4.

0 Normal

1 Discretamente anormal, contato com a tíbia mantido

2 Claramente anormal, saída da tíbia mais do que 3 vezes durante 3 ciclos

3 Gravemente anormal, saída da tíbia 4 ou mais vezes durante 3 ciclos

4 Incapaz de realizar a tarefa

Pontuação direito: Pontuação esquerdo:

Média dos dois lados (D + E /2):

TOTAL:



## 9.2 Termos de Consentimento Livre e Esclarecido:



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(maiores de 18 anos)

***Investigação Clínica e Genética da Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED), uma Forma Tratável de Doença Neuromuscular***

*Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.*

Eu, \_\_\_\_\_,  
(inserir nome e profissão), residente e domiciliado(a) em \_\_\_\_\_, portador(a) da Cédula de Identidade, RG \_\_\_\_\_, inscrito(a) no CPF/MF \_\_\_\_\_, nascido(a) em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo "Investigação Clínica e Genética da Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED), uma Forma Tratável de Doença Neuromuscular", e esclareço que obtive todas as informações.

Estou ciente que:

- I) Este estudo tem como objetivo traçar um perfil clínico e genético de pacientes com Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED) em acompanhamento no Hospital das Clínicas de São Paulo, identificando as características mais prevalentes nessa população, ampliando, assim, o conhecimento de todos os profissionais da saúde sobre essa condição.
- II) Será colhido material genético de mim através de esfregaço oral, método que não me submete a nenhum risco ou desconforto;
- III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o meu tratamento; não vai me curar e não vai me causar nenhuma dor;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

- V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa  
( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.  
( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VIII) Caso tenham sido tiradas fotografias,  
( ) concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário  
( ) concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde  
( ) não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.
- IX) O material colhido será armazenado sob a responsabilidade do Instituto de Biociências da USP, sob a guarda do Prof. Dr. Fernando Kok, pelo tempo necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação e/ou mecanismo genético responsável pela doença observada na minha família.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201 \_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) Pesquisador(a) Responsável

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

**No caso de haver dúvidas sobre aspectos éticos desse estudo, você poderá consultar:**

Devem ser informados endereço, email e telefone profissionais

**Pesquisador(a) Responsável:** Caroline Flores de Oliveira

Endereço: Av. Professor Mello Moraes, 1382

e-mail: carolflores@usp.br

Telefone para contato: (11) [REDACTED]

**Orientador(a):** Prof. Dr. Fernando Kok

Endereço: Rua Cubatão, 86, cj. 410 | São Paulo, Brasil - 04013-000

e-mail: fernando.kok@mendelics.com.br

Telefone para contato: (11) 5096-6001

**Para contato com o CEP-IB:**

Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos (CEP) do Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo

Rua do Matão – travessa 14, 321 – Cidade Universitária, CEP: 05508-090 – São Paulo –  
SP

Telefone (11) 3091-8761 - e-mail: cepibusp@ib.usp.br

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

***Investigação Clínica e Genética da Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED), uma Forma Tratável de Doença Neuromuscular***

*Seu (Sua) filho(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.*

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a) \_\_\_\_\_, nascido(a) em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, participe do estudo “*Investigação Clínica e Genética da Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED), uma Forma Tratável de Doença Neuromuscular*”, e esclareço que obtive todas as informações necessárias.

Estou ciente que:

- I) Este estudo tem como objetivo traçar um perfil clínico e genético de pacientes com Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED) em acompanhamento no Hospital das Clínicas de São Paulo, identificando as características mais prevalentes nessa população, ampliando, assim, o conhecimento dos profissionais da saúde sobre essa condição.
- II) Será colhido material genético do(a) meu filho(a) através de esfregaço oral, método que não submete meu filho(a) a nenhum risco ou desconforto;
- III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o tratamento do(a) meu(minha) filho(a); não vai curá-lo(a) e não vai causar nenhuma dor a ele(a);
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

- V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu(minha) filho(a), e sem que venha interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu(minha) filho(a) sejam mencionados;
- VII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa
- ( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.  
( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VIII) Caso tenham sido tiradas fotografias,
- ( ) concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário  
( ) concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde  
( ) não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.
- IX) O material colhido será armazenado sob a responsabilidade do Instituto de Biociências da USP, sob a guarda do Prof. Dr. Fernando Kok, pelo tempo necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação e/ou mecanismo genético responsável pela doença observada na minha família.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201 .

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Pesquisadora Responsável

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

**No caso de haver dúvidas sobre aspectos éticos desse estudo, você poderá consultar:**

Devem ser informados endereço, email e telefone profissionais

**Pesquisador(a) Responsável:** Caroline Flores de Oliveira

Endereço: Av. Professor Mello Moraes, 1382

e-mail: [carolflores@usp.br](mailto:carolflores@usp.br)

Telefone para contato: (11) [REDACTED]

**Orientador(a):** Prof. Dr. Fernando Kok

Endereço: Rua Cubatão, 86, cj. 410 | São Paulo, Brasil - 04013-000

e-mail: [fernando.kok@mendelics.com.br](mailto:fernando.kok@mendelics.com.br)

Telefone para contato: (11) 5096-6001

**Para contato com o CEP-IB:**

Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos (CEP) do Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo

Rua do Matão – travessa 14, 321 – Cidade Universitária, CEP: 05508-090 – São Paulo –  
SP

Telefone (11) 3091-8761 - e-mail: [cepibusp@ib.usp.br](mailto:cepibusp@ib.usp.br)

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

## TERMO DE ASSENTIMENTO

(Menor entre 12 e 18 anos)

Você está convidado(a) para participar, como voluntário(a), do Projeto de Pesquisa “Investigação Clínica e Genética da Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED), uma Forma Tratável de Doença Neuromuscular”

I – Este estudo tem como objetivo traçar um perfil clínico e genético de pacientes com Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED) em acompanhamento no Hospital das Clínicas de São Paulo, identificando as características mais prevalentes nessa população, ampliando, assim, o conhecimento de todos os profissionais da saúde sobre essa condição.

II - Para que participe desse estudo, a pessoa responsável por você deverá autorizar e assinar Termo de Consentimento.

III - Você receberá esclarecimento sobre qualquer aspecto da pesquisa que desejar e estará livre para participar ou não. A pessoa responsável por você poderá retirar o consentimento e interromper sua participação a qualquer momento.

IV- Sua participação é voluntária e a recusa em participar não trará qualquer prejuízo pedagógico, educacional ou para sua saúde.

V - Você não terá custos, nem receberá qualquer vantagem financeira.

VI - O material coletado se destina apenas a esse estudo; sua identidade será tratada conforme padrões profissionais de sigilo, e você não será identificado(a) em qualquer publicação gerada pela pesquisa.

VII – Esta pesquisa não implicará nenhum risco à saúde, integridade física, psíquica e moral ao participante.

VIII - Os resultados estarão a sua disposição, quando finalizada a pesquisa, e os dados referentes a você poderão ser liberados, com a permissão da pessoa responsável por você.

IX - O material coletado e os dados gerados ficarão arquivados no Hospital das Clínicas de São Paulo, sob a guarda do Prof. Dr. Fernando Kok.

X - Este termo de assentimento está impresso em duas vias, uma das quais fica com o(a) Pesquisador(a) Responsável e a outra, com você.

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado(a) sobre os objetivos do Projeto “*Investigação Clínica e Genética da Ataxia por Deficiência de Vitamina E (AVED), uma Forma Tratável de Doença Neuromuscular*”, de maneira clara e detalhada, e minhas dúvidas foram devidamente esclarecidas. Tendo o meu responsável assinado o Termo de Consentimento, declaro que concordo em participar desse estudo. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e que eu e a pessoa responsável por mim poderemos modificar a decisão sobre minha participação. Recebi uma via deste Termo de Assentimento e me foi dada a oportunidade de lê-lo e ter minhas dúvidas esclarecidas.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201 \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) menor

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pesquisadora responsável

**No caso de haver dúvidas sobre aspectos éticos desse estudo, você poderá consultar:**

**Pesquisador(a) Responsável:** Caroline Flores de Oliveira  
Endereço: Av. Professor Mello Moraes, 1382  
e-mail: carolflores@usp.br  
Telefone para contato: (11) \_\_\_\_\_

**Orientador(a):** Prof. Dr. Fernando Kok  
Endereço: Rua Cubatão, 86, cj. 410 | São Paulo, Brasil - 04013-000  
e-mail: fernando.kok@mendelics.com.br  
Telefone para contato: (11) 5096-6001

**Para contato com o CEP-IB:**  
Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos (CEP) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo  
Rua do Matão – travessa 14, 321 – Cidade Universitária, CEP: 05508-090 – São Paulo – SP  
Telefone (11) 3091-8761 - e-mail: [cepibusp@ib.usp.br](mailto:cepibusp@ib.usp.br)

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Pesquisador