

Investigação diagnóstica de erros inatos do metabolismo em um hospital universitário

Primeira submissão em 15/02/06
Última submissão em 02/03/07
Aceito para publicação em 07/03/07
Publicado em 20/06/07

Diagnostic investigation of inborn errors of metabolism in a university hospital

Fátima Aparecida Mazzini Amâncio¹, Fernanda Bertão Scalco², Cláudio Antonio Rabello Coelho³

unitermos	resumo
Erros inatos do metabolismo	<p>Objetivos: Estabelecer a frequência de erros inatos do metabolismo (EIMs) em uma amostra de pacientes com hipótese diagnóstica de EIM proveniente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e analisar a metodologia empregada nessa investigação. Amostra e métodos: Foram triadas para EIM, por testes químicos e técnicas cromatográficas, 1.233 amostras de urina de 905 pacientes. Resultados: O diagnóstico de EIM foi estabelecido em 18 (1,98%) pacientes; 12 deles apresentaram triagem (testes químicos e cromatografias) alterada para EIM. Todos os pacientes foram diagnosticados por análises enzimáticas. Conclusão: A frequência de EIMs diagnosticados neste estudo (1,98%), quando comparada com a literatura, foi satisfatória, uma vez que este grupo de pacientes foi proveniente de um único hospital. A metodologia provou ser eficaz, indicando 12 casos de EIM entre os 18 diagnosticados. O estudo mostra a importância de laboratórios especializados na detecção deste tipo de patologia.</p>
Triagem	

abstract key words

Objective: To establish the frequency of inborn errors of metabolism (IEM) in a cohort of patients with a diagnostic hypothesis of IEM, deriving from the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu of UNESP and to analyse the methodology used for this investigation. Methods: 1,233 urine samples from 905 patients were screened for IEM by chemical tests and chromatographic techniques. Results: IEM were diagnosed in 18 patients; twelve of these showed alterations in the IEM screening procedures (chemical tests and chromatography). All the 18 patients were diagnosed by enzymatic analyses. Conclusion: The IEM frequency diagnosed in this study (1.98%) was reasonable, since this group of patients came from a single hospital. The methodology proved to be efficient, indicating 12 IEM cases among the 18 diagnosed. The study shows the importance of specialized laboratories for the detection of this kind of pathology.

*Inborn errors of metabolism
Screening*

1. Bióloga; mestra em Pediatria responsável pelo Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

2. Pesquisador visitante do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

3. Professor-assistente; doutor do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP.

Trabalho realizado no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP.

Sem auxílio financeiro de agência de fomento.

Material de consumo e equipamentos: Laboratório Clínico, Hospital de Clínicas da UNESP de Botucatu-SP.

Baseado na dissertação de mestrado: "Investigação diagnóstica de erros inatos do metabolismo: testes de triagem e cromatografias – experiência de laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP", 2004. Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP.

Introdução

Os erros inatos do metabolismo (EIMs) são doenças determinadas geneticamente causadas por um defeito específico (geralmente enzimático) que leva ao bloqueio de uma determinada via metabólica. Esse bloqueio tem como consequência o acúmulo do substrato da enzima deficiente, a diminuição do produto da reação ou o desvio do substrato para uma via metabólica alternativa⁽¹⁵⁾.

Cerca de 500 EIMs diferentes foram identificados até o momento, correspondendo a cerca de 10% de todas as doenças genéticas⁽⁹⁾; ainda que individualmente raros, os EIMs são frequentes em conjunto, apresentando uma incidência cumulativa estimada em 1:1.000 recém-nascidos vivos⁽¹⁰⁾.

É importante que o diagnóstico de EIMs, que depende de laboratórios especializados, seja correto e rápido, uma vez que muitos possuem tratamentos. Esses tratamentos, quando administrados no tempo certo, podem amenizar ou até mesmo reverter um quadro clínico. De uma maneira geral, a avaliação laboratorial primária (triagem) busca a identificação de um metabólito acumulado através de testes químicos e cromatografias. A ocorrência de um teste positivo na triagem ou a apresentação, pelo paciente, de sinais e sintomas sugestivos de um EIM não-detectável pelos métodos de triagem devem ser investigadas por técnicas diagnósticas complementares, entre as quais podemos citar a determinação da atividade da enzima que se suspeita deficiente, a quantificação de aminoácidos, bem como a identificação do defeito molecular^(6, 13, 21, 28).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer a frequência de EIMs em uma amostra de pacientes com hipótese diagnóstica de EIM em um hospital universitário de nível terciário, bem como analisar a metodologia utilizada neste estudo.

Material e métodos

Foram estudadas 1.233 amostras de urina de 905 pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), de ambos os sexos, com idades entre 1 dia e 32 anos, durante o período de setembro de 1994 a dezembro de 2002 (estudo retrospectivo). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da mesma instituição. Todas as amostras foram submetidas à triagem urinária composta por sete testes químicos: clinitest⁽¹⁹⁾, cloreto férrico⁽⁴⁾, dinitrofenilidrazina⁽⁴⁾, nitrossonaftol⁽⁴⁾, p-nitroanilina⁽⁸⁾, cianeto-nitroprussiato⁽⁴⁾ e azul de toluidina⁽⁴⁾.

As amostras de pacientes que apresentaram resultados positivos em um ou mais dos referidos testes, ou, ainda, sinais clínicos sugestivos de EIM, passíveis de detecção por cromatografia em camada delgada (de aminoácidos, mono e dissacarídeos, mucopolissacarídeos ou oligossacarídeos), foram analisadas de acordo com as técnicas de Éfron *et al.*⁽⁷⁾, 1964; Metha e Satini, 1974⁽¹⁵⁾; Humbel *et al.*, 1972⁽¹⁴⁾ e Sewell, 1979⁽²²⁾.

Amostras de sangue e urina dos pacientes com cromatografias alteradas, bem como de pacientes com suspeita de EIMs não-detectáveis pela metodologia empregada, foram enviadas para outros laboratórios (laboratórios de referência em EIM) para confirmação dos resultados e ou hipótese diagnóstica através de técnicas complementares.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, of. 471/2003-CEP MACAH/asc.

Comparações entre duas proporções foram realizadas pelo método z.

Comparações entre frequências de mais de duas proporções foram realizadas pelo teste do χ^2 .

Foram consideradas significativas as diferenças cujo *p* do erro α fosse menor que 0,05. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Sigma Stat.

Resultados

Entre os 905 pacientes estudados, 524 (58%) do sexo masculino e 381 (42%) do feminino, a média de idade apresentada foi de 4 anos, 8 meses e 18 dias. Foram diagnosticados 18 EIMs nessa amostra (**Tabela 1**), sendo que, desses, 12 tiveram indicação pelos métodos de análise laboratorial empregados no estudo. A cromatografia de aminoácidos indicou doença do xarope do bordo (leucínose) e síndrome de Fanconi. A cromatografia de mucopolissacarídeos indicou quatro casos de síndrome de Hurler e três de síndrome de Sanfilippo. Três amostras positivas na triagem para açúcares apresentaram bandas na região de aplicação da cromatografia de mono e dissacarídeos, sugerindo algum tipo de oligossacarídeos. Pela cromatografia de oligossacarídeos foram confirmados três casos de gangliosidose GM1.

Um paciente com testes químicos e cromatografia negativos foi diagnosticado com hiperglicemia não-cetótica (diagnóstico realizado pela análise da clínica do paciente combinada a exames complementares terceirizados).

Tabela 1**EIMs diagnosticados em uma amostra de 905 pacientes**

Diagnóstico	Número de casos
Doença da urina do xarope do bordo	1
Síndrome de Fanconi	1
Síndrome de Hurler	4
Síndrome de Sanfilippo	3
Síndrome de Mórquio	1
Gangliosidose GM1	3
Hiperglicemia não-cetótica	1
Doença de Krabbe	1
Leucodistrofia metacromática	2
Deficiência de biotinidase	1
Total	18

Três dos 56 pacientes com teste de azul de toluidina alterado, cromatografia de MPS negativa e apresentando quadro clínico sugestivo de EIM tiveram amostras de sangue enviadas para medida de atividades enzimáticas (análises terceirizadas), tendo sido detectado um caso de doença de Mórquio e dois de leucodistrofia metacromática.

Um caso com suspeita clínica de doença de Krabbe (que não é detectada pelos testes químicos e cromatografias empregados neste estudo) teve a triagem negativa e o diagnóstico confirmado por dosagem enzimática. Outro

caso confirmado por análise enzimática foi o de um paciente com deficiência de biotinidase. Este caso não apresentou alteração no teste da dinitrofenilidrazina, que pode estar alterado nesta patologia. Isso pode ser explicado pelo fato de esse teste não ser específico para análise de deficiência de biotinidase.

Os resultados demonstram que o grupo de EIM conhecido como doenças lisossômicas de depósito foi o mais freqüente na amostra estudada (Tabela 1), correspondendo a 77,8% dos casos diagnosticados.

Dos 905 pacientes analisados laboratorialmente, 269 (29,7%) apresentaram resultados alterados em um ou mais testes químicos e 636 (70,3%) foram negativos em todos os testes. A **Tabela 2** representa o resultado percentual das alterações encontradas nos testes químicos e cromatografias para EIM dos 269 pacientes com um ou mais testes químicos alterados. Desses 269 casos, a freqüência de alteração para açúcares foi significativamente maior ($Z = 4,553$; $p < 0,001$) do que a de testes negativos; e a de testes alterados para aminoácidos foi significativamente menor ($Z = 5,782$; $p < 0,001$) do que os testes negativos. A freqüência de testes alterados para mucopolissacarídeos também foi significativamente menor ($Z = 11,047$; $p < 0,001$) do que os testes negativos. A freqüência de alteração nas cromatografias de açúcares foi significativamente maior do que a das não-alteradas quando se aplicou o teste Z para comparação de duas proporções ($Z = 4,553$; $p \leq 0,001$), o mesmo aconteceu para as cromatografias de aminoácidos ($Z = 5,782$; $p \leq 0,001$) e de mucopolissacarídeos ($Z = 11,047$; $p \leq 0,001$).

Tabela 2**Freqüência de alterações encontradas na triagem (testes químicos e cromatografias) para EIM em 269 pacientes com um ou mais testes químicos positivos**

	Número de amostras positivas (%)	Número de amostras negativas (%)
TQ para açúcares*	161 (59,8)	108 (40,1)
Cromatografia mono e dissacarídeos de 161 amostras com TQ positivos para açúcares	42 (26)	119 (74)
TQ para Aa**	101 (37,5)	168 (62,5)
Cromatografia Aa de 101 amostras com TQ positivos para Aa	27 (26,7)	74 (73,3)
TQ para MPS***	70 (26)	199 (74)
Cromatografia MPS de 70 amostras com TQ positivo para mucopolissacarídeos	14 (20)	56 (80)

TQ = testes químicos; Aa= aminoácidos, MPS = mucopolissacarídeos; *TQ para açúcares redutores composto do teste de Benedict; **TQ para aminoácidos composto dos testes de cloreto férrico, dinitrofenilidrazina, nitrossonafol e cianeto-nitroprussiato; ***TQ de mucopolissacarídeos composto do teste do azul de toluidina.

Tabela 3 Porcentagens de diagnóstico de EIM em amostras selecionadas por diferentes autores por apresentarem suspeita clínica de doença metabólica

Autores (ano de publicação)	%
Neves <i>et al.</i> (presente trabalho)	1,98
Oliveira <i>et al.</i> (2001) ⁽¹⁸⁾	3
Coelho <i>et al.</i> (2001) ⁽⁶⁾	8,5
Simoni <i>et al.</i> (1998) ⁽²⁴⁾	7,2
Giugliani e Coelho (1997) ⁽¹¹⁾	4,9
Castejón (1995) ⁽⁵⁾	0,9
Arens <i>et al.</i> (1993) ⁽¹⁾	4,2
Turcato (1990) ⁽²⁷⁾	1,6
Wannmacher <i>et al.</i> (1990) ⁽³⁰⁾	5,9
Berry (1977) ⁽³⁾	0,8
Schmidt e Diamant (1972) ⁽²⁰⁾	3,9

O teste químico de triagem indicativo de acidúria metilmalônica (teste da paranitroanilina) foi negativo nos 905 pacientes testados.

Discussão e conclusão

A incidência de EIM encontrada em nosso estudo, de 1,98% em 905 pacientes, está dentro da esperada quando comparada com as encontradas na literatura (**Tabela 3**), uma vez que se trata de uma amostra regional e proveniente de um único hospital-escola. A diferença de porcentagens encontradas pelos diversos autores pode ser explicada de várias formas, como número amostral, população estudada, tipo de testes aplicados, entre outros fatores. Como citado por Wajner *et al.*, 1986⁽²⁹⁾, a frequência de EIM depende do número de testes aplicados e também do critério de seleção (sinais sugestivos de EIM) dos pacientes a serem triados.

Com base na análise dos dados clínicos anexados à solicitação de exames da nossa amostra de estudo, foi possível detectar que 547 (60,5%) pacientes apresentavam algum tipo de encefalopatia e parece ser esta a principal sintomatologia clínica que levou à suspeita de EIM neste estudo.

Analisando as frequências de resultados alterados e negativos entre os testes químicos e cromatografias, podemos observar que, no geral, encontramos mais resultados negativos, o que era de se esperar em se tratando de doenças raras. Entre aqueles resultados alterados nos testes químicos encontramos muitas amostras com resultados que podem ser considerados falso-positivos, ou seja, não são EIM,

embora apresentem algum teste alterado. Isso pode ser explicado, uma vez que vários fatores podem interferir nos testes químicos de triagem, como doses maciças de alguns antibióticos, ácido ascórbico e hidratos de coral (alterando o teste de Benedict)⁽¹²⁾, uso de outros medicamentos, principalmente anticonvulsivantes e penicilina, alimentação rica em proteínas, disfunção hepática severa e anemia (alterando os testes para aminoácidos)^(2, 23, 26), lúpus eritematoso, artrite reumatóide, carcinomatose, síndrome de Marfan e eliminação transitória de mucopolissacarídeos no início da vida (alterando o teste do azul de toluidina)^(11, 17), entre outros.

O caso de Mórquio, cujo teste do azul de toluidina apresentou alteração, mas a cromatografia foi negativa, foi considerado resultado falso-negativo, já que a cromatografia de mucopolissacarídeos na urina deveria ter indicado aumento na concentração de sulfato de keratan. Este falso-negativo poderia ser explicado por uma amostra de urina muito diluída ou, ainda, diminuição da excreção de mucopolissacarídeos pela idade^(4, 11). O caso de hiperglicidemia não-cetótica também foi considerado falso-negativo, posto que a cromatografia de aminoácidos deveria ter indicado um aumento na concentração de glicina. Esse falso-negativo poderia ser explicado, entre outros fatores, por urina muito diluída ou ingestão protéica insuficiente⁽²⁵⁾.

Os dois casos de leucodistrofia metacromática que apresentaram teste de azul de toluidina alterado e cromatografia de MPS negativa se explicam pelo fato de a cromatografia de MPS ser mais sensível que o teste químico, não sendo a técnica de análise específica para esta doença.

O número de EIM aqui diagnosticados mostra que estas disfunções devem ser pesquisadas sempre que um paciente apresente distúrbios metabólicos e/ou manifestações neurológicas sem causa determinada, em paralelo com outras possibilidades diagnósticas. A metodologia utilizada mostrou-se eficaz, uma vez que permitiu o diagnóstico e a exclusão de EIM.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Referência em Erros Inatos do Metabolismo do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pelo suporte metodológico.

À professora Maria Lúcia Costa de Oliveira pela revisão deste manuscrito.

A Ruth Ellen Simoni pela revisão do inglês.

Referências

1. ARENS, R. et al. Recurrent apparent life-threatening events during infancy: a manifestation of inborn errors of metabolism. *J. Pediatr*, v. 123, p. 415-8, 1993.
2. BERRY, H. K. Detection of metabolic disorders among mentally retarded children by means of paper spots tests. *Am J Ment Defic*, v. 66, p. 555-60, 1962.
3. BERRY, H. K. Screening for metabolic disorders among high-risk infants and children. *Health Lab Sci*, v. 14, p. 183-93, 1977.
4. BUIST, N. R. M. Set of simple side-room urine for detection of inborn errors of metabolism. *Br Med J*, v. 2, p. 745-9, 1968.
5. CASTEJON, M. J. *Erros inatos do metabolismo em pacientes com deficiência mental*. 1995. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.
6. COELHO, J. C. et al. Selective screening of 18.000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Revista HCPA*, v. 3, p. 286-93, 2001.
7. EFRON et al. A simple chromatographic screening test for the detection of disorders of aminoacid metabolism. *New Engl J Med*, vol. 270, p. 1378, 1964.
8. GIORGIO, A. J.; LUHBY, A. L. A rapid screening tests for the detection of congenital methylmalonic aciduria in infancy. *Am J Clin Pathol*, v. 52, p. 374-9, 1969.
9. GIMENEZ-SANCHES, G.; CHILDS, B.; VALLE, D. The effect of mendelian disease on human health. In: SCRIVER, C. H. et al. (eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 67-174.
10. GIUGLIANI, R.; COELHO, J. C. Diagnóstico de erros inatos do metabolismo da América Latina. *Braz J Gen*, v. 20, p. 147-54, 1997.
11. GIUGLIANI, R. et al. Age-related concentrations of glycosaminoglycans in random urine: a contribution to the laboratorial detection of mucopolysaccharidoses. *Rev Bras Genet*, v. 13, p. 599-605, 1990.
12. HILL, A.; CASEY, R.; ZALESKI, W. A. Difficulties and pitfalls in the interpretation of screening tests for the detection of inborn errors of metabolism. *Clin Chim Acta*, v. 72, p. 1-15, 1976.
13. HOFFMAN, G. F. Selective screening for inborn errors of metabolism: past, present and future. *Eur J Pediatr*, v. 153, p. S2-S8, 1994.
14. HUMBEL, R.; CHAMOLES, N. A. Sequential thin layer chromatography of urinary acidic glycosaminoglycans. *Clin Chim Acta*, v. 40, p. 290-3, 1972.
15. KARAM, S. M.; SCHWARTZ, I. V. D.; GIUGLIANI, R. Introdução e aspectos clínicos. In: CARAKUSHANSKY, G. (ed.). *Doenças genéticas em pediatria*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. p. 155-8.
16. MEHTA, H.; SATINI. Separation of aminoacids from untreated urine on thin-layers of silica-gel. *J Chromat*, v. 96, p. 148-50, 1974.
17. MENKES, J. H. Metabolic errors affecting the nervous system. *Clinical Proceedings Childrens Hospital*, v. 22, p. 227-35, 1966.
18. OLIVEIRA, A. C. et al. Screening for inborn errors of metabolism among newborns with metabolic disturbance and/or neurological manifestations without determined cause. *Rev Paul Med*, v. 119, p. 160-4, 2001.
19. PERRY, T. L.; HANSEN, B. A.; MACDOUGALL, L. Urinary screening tests in the prevention of mental deficiency. *Can Med Assoc J*, v. 95, p. 89-95, 1966.
20. SCHIMIDT, B. J.; DIAMENT, A. J. Testes de triagem (screening) para erros inatos do metabolismo. *Rev Bras Defic Mental*, v. 7, p. 34, 1972.
21. SEASHORE, M. R.; RINALDO, P. Metabolic disease of the neonate and young infant. *Semin Perinatol*, v. 17, p. 318-29, 1993.
22. SEWELL, A. An improved thin layer chromatographic method for urinary oligosaccharide screening. *Clin Chim Acta*, v. 92, p. 41-4, 1979.
23. SHIH, V. E. Detection of hereditary metabolic disorders involving amino acids and organic acids. *Clin Biochem*, v. 24, p. 301-9, 1991.
24. Simoni, R. E. Screening for inborn errors of metabolism in high risk children from Rio de Janeiro, Brazil. *Early Hum Develop*, v. 50, p. 305-11, 1998.
25. STUBER, A. Screening tests and chromatography for detection of inborn errors of metabolism. *Clin Chim Acta*, v. 36, p. 309-13, 1972.
26. THOMAS, G. H.; HOWELL, R. R. *Select screening tests for genetic metabolic disorders*. Year Book Medical Publishers (Chicago), 1973.
27. TURCATO, M. F. *Pesquisa de erros inatos do metabolismo através de testes de triagem urinários no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto*. 1990. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1990.

28. WABER, L. Inborn errors of metabolism. *Pediatr Ann*, v. 19, p. 105-117, 1990.
29. WAJNER, M. *et al.* Detection of inborn errors of metabolism in patients of pediatric intensive care units of Porto Alegre, Brazil. Comparison of the prevalence of such disturbances in a selected and an unselected sample. *Braz J Gen*, v. 9, p. 331-40, 1986.
30. WANNMACHER, C. M. D. *et al.* Detection of metabolic disorders among high-risk patients. *Rev Bras Genet*, v. 5, p. 187-94, 1982.

Endere o para correspond ncia

F tima Aparecida Mazzini Am ncio
Rua Antonio Greg rio, 205 - Rubi o Junior
CEP: 18618-000 - Botucatu-SP
email: amanciofatima@bol.com.br