

## Investigação de erros inatos do metabolismo

Moacir Wajner<sup>1</sup>, Carmen R. Vargas<sup>1</sup>, Maira Burin<sup>1</sup>,  
Roberto Giugliani<sup>1</sup>, Janice C. Coelho<sup>1</sup>

*Os erros inatos do metabolismo são doenças metabólicas hereditárias individualmente raras, mas que em seu conjunto apresentam uma incidência aproximada de pelo menos 1 caso para cada mil nascimentos. O presente trabalho teve por objetivos descrever as principais manifestações clínicas, bem como os protocolos gerais de investigação diagnóstica para a maioria destes distúrbios. Para fins práticos, estas doenças foram divididas em duas categorias: das moléculas pequenas (aminoacidopatias, acideias orgânicas, etc) e das moléculas complexas (doenças lisossômicas de depósito, doenças peroxissomais, etc). Alguns grupos mais prevalentes de erros inatos do metabolismo, tais como as aminoacidopatias, as acidemias orgânicas e as mucopolissacaridoses, foram discutidos com maior ênfase.*

Unitermos: Erros inatos do metabolismo; investigação diagnóstica; doenças metabólicas.

### **Investigation of inborn errors of metabolism**

*Inborn errors of metabolism are inherited metabolic disorders individually rare, but, taken together, their overall frequency is about 1 case out of 1000 newborns. The present study aimed to describe the main clinical features, as well as the general principles of investigation for these diseases. They were divided into two categories, one of the small molecules (aminoacidopathies, organic acidemias, etc) and the other of the complex molecules (lysosomal storage disorders, peroxisomal disorders, etc). Some of the most frequent groups of inborn errors of metabolism such as the aminoacidopathies, the organic acidemias and the mucopolissacharidosis, were discussed in detail.*

Key-words: Inborn errors of metabolism; diagnostic investigation; metabolic diseases.

---

Revista HCPA 2001(3):343-360

### **Introdução**

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são distúrbios hereditários transmitidos, na sua quase totalidade, de maneira autossômica recessiva. Individualmente são doenças raras, mas em seu conjunto (mais de 450 distúrbios) atingem pelo menos 1 para cada mil nascimentos (1). Tendo em vista que apenas

poucas dessas desordens são diagnosticadas no recém-nascido através da triagem neonatal em massa para doenças metabólicas que é realizada em países desenvolvidos e em alguns em desenvolvimento, o médico deve estar atento para um conjunto de sintomas e sinais que indicam a necessidade para uma investigação direcionada para o diagnóstico desses distúrbios (2). No entanto, embora a

---

<sup>1</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. Correspondência: Dr. Moacir Wajner, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: +55-51-3316 8011; e-mail:mwajner@hcpa.ufrgs.br

história clínica de um paciente afetado por estas desordens seja importante, uma vez que dirige a investigação para uma doença ou um grupo de doenças, o diagnóstico dos EIM é fundamentalmente laboratorial (3,4).

O pensamento usual do médico frente a um paciente com sintomatologia de causa desconhecida é que, devido à raridade dos EIM, deve-se pensar na possibilidade desses distúrbios somente após excluir-se as doenças mais comuns. No entanto, a demora no diagnóstico para os casos mais graves pode ser fatal, sendo que uma parcela considerável dos pacientes afetados morre sem diagnóstico ou com o diagnóstico de septicemia ou parada cardiorrespiratória. Convém enfatizar que em muitos casos as infecções precipitam, agudizam e acompanham o quadro clínico dos pacientes com erros inatos do metabolismo. Os resultados da autópsia são também inconclusivos de uma forma geral, excetuando algumas doenças lisossômicas de depósito ou de oxidação de ácidos graxos em que se identifica a presença de grandes quantidades do substrato (glicogênio, mucopolissacarídeos, lipídeos, etc.) armazenado em alguns tecidos. Por outro lado, a maioria dos pediatras acredita que os EIM se manifestam apenas de forma inespecífica com retardo mental e convulsões, ignorando os sintomas específicos que caracterizam várias dessas doenças, especialmente as doenças lisossômicas de depósito.

Além disso, é comum confundir as doenças hereditárias com as congênitas, visto que os EIM não se manifestam geralmente ao nascimento. Embora os sintomas na maioria dos casos se manifestem no primeiro ano de vida, podem ocorrer na adolescência ou mesmo na vida adulta.

Para simplificar a investigação dos EIM, podemos dividi-los em dois grandes grupos, o das moléculas pequenas (aminoacidopatias, acidemias orgânicas, intolerância à açúcares, etc.) e o das moléculas complexas (doenças lisossômicas de depósito, peroxissomais, etc.). Nos EIM de moléculas grandes, os sintomas são permanentes, progressivos, independentes da ocorrência de infecções, jejum, cirurgias ou outras situações com catabolismo acelerado e não estão relacionados com a ingestão alimentar. Já os

pacientes afetados por defeitos do metabolismo das moléculas pequenas apresentam sintomas de intoxicação e/ou de deficiência de energia. A intoxicação se deve ao acúmulo dos metabólitos proximais ao defeito metabólico e se caracterizam clinicamente por um período assintomático seguidos por sintomas de intoxicação aguda (vômitos, coma, insuficiência hepática, convulsões, distúrbios respiratórios, etc.) ou de deficiência energética (atraso no desenvolvimento físico e psicomotor, hipotonia generalizada, cardiomiopatia, acidemia láctica, hipoglicemia, morte súbita na infância, malformações, etc.).

O objetivo deste artigo é o de familiarizar o médico com os sintomas/sinais clínicos mais freqüentes e com os procedimentos utilizados no diagnóstico de EIM para que o mesmo possa melhor indicar os pacientes suspeitos para a análise laboratorial e melhor interpretar os resultados das investigações laboratoriais.

### ***Sintomas sugestivos de doenças metabólicas hereditárias***

O paciente com EIM usualmente apresenta uma gama de sintomas e sinais clínicos que devem alertar o médico para esse grupo de patologias. A forma de aparecimento dos sintomas é um fator importante na distinção entre os dois grandes grupos de EIM. Os defeitos do metabolismo intermediário que levam ao acúmulo de moléculas pequenas (ex., aminoácidos e ácidos orgânicos) geralmente tem uma apresentação clínica súbita e a evolução se caracteriza por episódios de agudização recorrentes geralmente precedidos por infecções, ingestão alimentar exagerada de alimentos específicos, cirurgia, jejum ou outras condições de catabolismo elevado, pois nestas situações ocorre degradação de proteínas ou lipídeos que vão originar os metabólitos tóxicos (ex., defeitos do ciclo da uréia e acidemias orgânicas). Nos intervalos entre as crises os pacientes podem estar clinicamente normais. Para muitas destas doenças é, portanto, essencial que as amostras para análise laboratorial sejam coletadas nos momentos de crise metabólica. O exame físico geralmente é inespecífico, assim como os exames histopatológicos dos órgãos mais afetados. O

tratamento agudo com restrição alimentar específica (proteínas, lipídeos ou glicídeos) associado ou não à suplementação de vitaminas (que ajudam as reações enzimáticas) mostra resultados extraordinários, retirando o paciente da crise em poucas horas. Um outro grupo dessas patologias mostra uma evolução crônica desde o nascimento ou nos primeiros meses ou anos de vida. Nesses casos, a intoxicação é crônica (ex., fenilcetonúria) e os afetados apresentam um atraso na aquisição das habilidades motoras (ex., caminhar) não adquirindo em muitos casos as habilidades cognitivas normais. A tabela 1 mostra os principais achados clínico-laboratoriais que

devem levar à suspeita de um EIM de intoxicação ou de deficiência energética (moléculas pequenas).

Os EIM de moléculas complexas ou de organelas (doenças lisossômicas de depósito e peroxisomais) manifestam-se na sua quase totalidade de uma forma crônica e progressiva, atingindo tecidos e órgãos (fígado, baço, medula óssea e encéfalo), onde os substratos (glicogênio, lipídeos complexos, mucopolissacarídeos) que não podem ser degradados se depositam. É comum encontrar nesses pacientes dismorfias e sinais clínicos específicos (hepatomegalia, esplenomegalia, leucodistrofia, etc). A doença geralmente se manifesta após os primeiros

**Tabela 1.** Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas pequenas

Neonato

- Vômitos incoercíveis
- Recusa alimentar
- Hipotonia/hipertonia
- Letargia, coma intermitente
- Convulsões de causa desconhecida
- Mioclonias
- Miopatia/cardiomiopatia
- Taquipnéia/apnéia
- Dismorfismo
- Odor peculiar na urina ou no paciente
- Macrocefalia

Criança até os 10 anos de idade

- Intolerância alimentar
- Atraso no desenvolvimento físico e psicomotor
- Ataxia, hipotonia, coreoatetose, paraparesia espástica, marcha anormal, microcefalia/macrocefalia, distúrbio de comportamento
- Hepatomegalia/hepatopatia, pancreatite, urolitíase, disfunção tubular renal
- Deslocamento de cristalino, atrofia ótica
- Alterações esqueléticas
- Alopécia, alterações pigmentares na pele e cabelos
- Odor peculiar na urina ou no paciente
- Doença aguda precipitada por estresse (infecção, cirurgia ou indiscrição alimentar)

Adolescente até a fase juvenil

- Retardo mental, estupor ou ataxia episódica, sintomas neuropsiquiátricos, letargia, coma
- Oclusão vascular prematura
- Hepatomegalia, urolitíase
- Deslocamento do cristalino, retinite pigmentar
- Alterações esqueléticas
- Odor peculiar
- Doença aguda precipitada por estresse (infecção, cirurgia ou indiscrição alimentar)

**Tabela 2** Principais manifestações clínicas dos erros inatos do metabolismo de moléculas complexas

---

|  |
|--|
| Retardo mental progressivo             |
| Dismorfias (gargolismo, etc.)          |
| Anormalidades no esqueleto             |
| Hepatoesplenomegalia                   |
| Atraso no desenvolvimento              |
| Opacidade de córnea                    |
| Comportamento agressivo/Irritabilidade |
| Dificuldade auditiva e visual          |

---

meses ou anos de vida e é comum o afetado perder as habilidades motoras e cognitivas que já tinham sido adquiridas. Os exames histopatológicos, nos afetados por várias dessas doenças, são bastante informativos (presença de glicogênio no fígado nas glicogenoses, de lipídeos específicos em vários tecidos nas lipidoses, etc.). O tratamento dessas doenças, no entanto, é bastante escasso, como veremos no artigo sobre o tratamento dos EIM. A tabela 2 mostra sinais clínicos que levam à suspeita de doenças de moléculas complexas.

### **Diagnóstico**

É importante determinar-se inicialmente o grau de comprometimento dos tecidos ou órgãos envolvidos no paciente suspeito de ser afetado por um EIM. Vários exames de rotina são úteis para tal finalidade e incluem testes bioquímicos e hematológicos (gasometria arterial, eletrólitos, lactato, piruvato, corpos cetônicos, amônia, glicose, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, testes de função hepática, exames hematológicos de rotina e hormônios da tireóide (tiroxina e triiodotironina) e das suprarenais (cortisol), bem como eletrofisiológicos (EEG, EMG e ECG), radiológicos (radiografia, ecografia, tomografia e ressonância magnética) e histopatológicos que fazem parte da primeira etapa da investigação.

### **Doenças de intoxicação ou de deficiência de energia (moléculas pequenas)**

Quando o paciente não apresenta sintomas sugestivos de doenças lisossômicas

de depósito, o protocolo para a investigação laboratorial inicial é dirigido principalmente para o diagnóstico dos EIM de moléculas pequenas. Denomina-se arbitrariamente de triagem simples a investigação para doenças metabólicas hereditárias, objetivando a detecção de metabólitos de pequeno peso molecular acumulados no sangue e/ou excretados na urina dos afetados. A triagem simples contempla uma bateria de testes urinários, bem como cromatografia semiquantitativa de aminoácidos em sangue e urina. A tabela 3 mostra os principais testes de triagem urinários. Para a interpretação correta desses testes, é importante o laboratório receber informações relativas ao quadro clínico do paciente, idade, dieta especial e medicações, visto que existe variação na excreção de metabólitos ao longo do desenvolvimento e vários medicamentos e produtos da dieta podem interferir nos testes. Convém salientar ainda a importância das fitas impregnadas com reagentes (multistix) para a detecção de substâncias como glicose, corpos cetônicos, bilirrubinas, nitritos, hemoglobina e sulfitos, assim como o pH.

Em sua maioria, os testes listados não são específicos, mas o resultado positivo indica a necessidade de avaliações mais específicas, direcionando a investigação para exames mais dirigidos. Assim, o resultado positivo no teste de Benedict indica a presença de um açúcar redutor e nos direciona para a identificação do composto acumulado, o que pode ser realizado por cromatografia em camada delgada de glicídeos na urina. A presença de galactose neste último teste, pode indicar uma

**Tabela 3.** Testes de triagem na urina para erros inatos do metabolismo

| Teste                  | Metabólito detectado             | EIM  |
|------------------------|----------------------------------|--|
| Benedict (Cliniteste)  | Açúcares redutores               | Galactosemia, intolerância à frutose, glicosúria renal           |
| Dinitrofenilhidrazina  | a-cetoácidos                     | Acidúrias orgânicas  |
| p-Nitroanilina         | Ácido metilmalônico              | Acidúria metilmalônica   |
| Cianeto-nitroprussiato | Cistina/homocistina              | Cistinúria/homocistinúria  |
| Nitrosonaftol          | Tirosina e derivados da tirosina | Tirosinemia  |
| Teste do Sulfito       | Sulfitos                         | Def. de sulfito oxidase,<br>Deficiência do cofator<br>Molibdênio |
| Cloreto férrico        | Cetoácidos                       | Fenilcetonúria   |

galactosemia, enquanto a presença de frutose sugere intolerância hereditária à frutose e a glicose a glicosúria renal ou a síndrome de Fanconi de causa primária ou secundária. Para a definição do tipo de galactosemia, devem ser medidas as enzimas possivelmente deficientes, como a galactose-1-fosfato uridil transferase, cuja baixa atividade está relacionada à galactosemia clássica. Os testes dinitrofenilhidrazina e p-nitroanilina, quando positivos, direcionam a investigação para as acidúrias orgânicas. Nestes casos, a realização de uma cromatografia gasosa de ácidos orgânicos é indicada. No caso da p-nitroanilina, um resultado positivo indica fortemente a possibilidade de acidúria metilmalônica. Já o teste para a detecção de sulfitos aponta para a possibilidade da deficiência de sulfito oxidase e do metabolismo do cofator molibdênio. O teste do cianeto-nitroprussiato indica a presença de grupamentos sulfidril que são característicos da cistinúria e homocistinúria (com nitrato de prata) e o do nitrosonaftol, por detectar a presença de metabólitos da tirosina, indica o diagnóstico da tirosinemia. Já o teste do cloreto férrico indica a presença de cetoácidos (fenilcetonúria). Esses testes devem ser realizados simultaneamente com a cromatografia de aminoácidos.

A cromatografia de aminoácidos pode ser realizada em camada delgada ou em papel. É um teste semiquantitativo, pois somente observamos a presença de bandas aumentadas, maiores que aquelas presentes

nos controles normais, indicando que aquele aminoácido está em quantidade acima do normal (5). Pode ser realizada tanto em sangue quanto em urina, e sua execução em laboratórios não especializados é plenamente possível. Esta cromatografia, apesar de ser simples e de baixo custo, pode diagnosticar ou indicar o diagnóstico de dezenas de aminoacidopatias. A figura 1 mostra uma cromatografia de aminoácidos em papel em que a glicina está elevada na urina. Quando observamos que o aminoácido está em concentração mais elevada, é aconselhável realizar uma dosagem quantitativa do mesmo para se verificar o valor exato da concentração do aminoácido, o que pode ser feito por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (6), cromatografia de troca iônica (analisador automático de aminoácidos). Convém frisar, no entanto, que esta cromatografia semi-quantitativa não deve ser indicada na suspeita de doenças do ciclo da uréia (citrulinemia, argininemia, etc), pois não possui sensibilidade para detectar aumento ou diminuição dos metabólitos envolvidos nessas doenças. Para esses casos, o teste de escolha é a determinação quantitativa de aminoácidos.

Relativamente a outros grupos de erros inatos do metabolismo (EIM), as aminoacidopatias e as acidemias orgânicas são consideradas as mais frequentes doenças metabólicas em crianças severamente enfermas (7,8). Portanto, abordaremos a seguir esses dois grupos de EIM.

As aminoacidopatias (AAC) e as

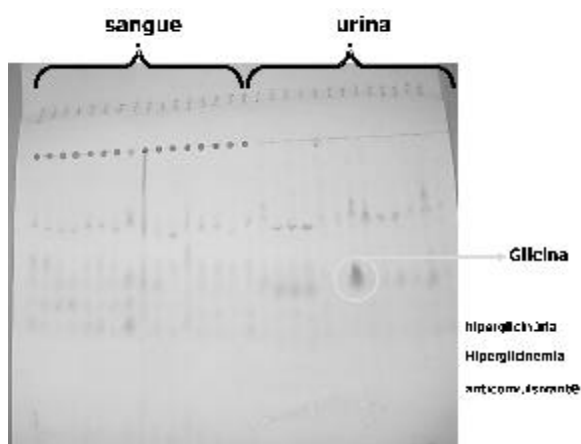


Figura 1. Cromatografia em papel de aminoácidos em sangue e urina.

acidemias orgânicas (AO) são doenças hereditárias em que ocorre acúmulo tecidual, respectivamente, de um aminoácido e algumas vezes de seus derivados (AAC) ou de um ou mais ácidos orgânicos (AO), refletindo-se no aumento de suas concentrações nos líquidos biológicos (sangue, urina, líquido, etc) (1,2,9). Esses distúrbios são causados por deficiência severa da atividade de uma enzima, usualmente do metabolismo dos aminoácidos (AAC e AO), podendo também comprometer o metabolismo dos lipídeos ou dos carboidratos (AO). Nas AAC, o bloqueio da rota metabólica resulta no aumento de um aminoácido no sangue e na urina dos afetados. As aminoacidopatias também podem ocorrer secundariamente a defeitos no transporte de aminoácidos, principalmente no nível dos túbulos renais. Nesses casos, vários aminoácidos, carregados pelo mesmo sistema de transporte, têm suas concentrações elevadas na urina, sem qualquer alteração na concentração sérica. Nas AO, o bloqueio da rota metabólica resulta no aumento na concentração de vários ácidos orgânicos detectados principalmente na urina dos doentes. Conhecemos mais de uma centena desses distúrbios cujo defeito molecular está bem definido.

Estima-se que a prevalência global das acidúrias orgânicas é de 1 para cada 2.200 recém-nascidos, enquanto na Arábia Saudita, onde a taxa de consanguinidade é elevada, é

de pelo menos 1:740 nascimentos (8,10), sendo a prevalência das aminoacidopatias ainda mais alta (1). Por outro lado, a prevalência individual das AAC e AO na população geral é conhecida apenas para aquelas enfermidades que fazem parte da triagem neonatal em massa para erros inatos do metabolismo. Nesse particular, as de mais alta frequência são a fenilcetonúria (1:10.000) (AAC) e as acidemias metilmalônica, propiônica e glutárica tipo I (1:40.000 à 1:50.000 cada) (AO).

Embora o diagnóstico clínico dessas doenças seja difícil dada a variabilidade da sintomatologia, para a maioria delas os sinais mais evidentes são neurológicos, o que atesta a suscetibilidade do sistema nervoso central (SNC) à toxicidade dos aminoácidos ou seus derivados (AAC) e dos ácidos orgânicos (AO) acumulados. Em vários casos, os compostos que se acumulam, tais como a fenilalanina (fenilcetonúria) e a leucina, isoleucina e valina (doença do xarope do bordo) são nutrientes essenciais em concentrações normais e agentes tóxicos em concentrações elevadas. Na hiperglicinemia não cetótica ocorre dano grave no SNC porque este aminoácido é um neurotransmissor, causando perturbações graves no funcionamento do SNC quando em excesso. Déficit de produção energética causado por metabólitos acumulados no cérebro pode também levar à dano neurológico, como ocorre em várias acidemias orgânicas.

O diagnóstico das aminoacidopatias e

das acidemias orgânicas é fundamentalmente laboratorial e usualmente feito por um aumento significativo (2 a 50 vezes os valores normais de referência) na concentração sérica de um aminoácido para as AAC e na concentração urinária de vários ácidos orgânicos nas AO. Para o caso das aminoacidopatias, a investigação é rotineiramente feita em sangue e urina, visto que pequenas elevações ou diminuições de aminoácidos só podem ser observadas no sangue, enquanto nos defeitos de transporte tubular renal as anormalidades serão mais evidentes na urina e caracterizadas por um aumento na excreção de vários aminoácidos. Com exceção da hiperglicinemia não cetótica e dos defeitos do metabolismo da serina, o líquido céfalo-raquidiano é raramente útil no diagnóstico das aminoacidopatias. Deve-se, no entanto, salientar que alterações nos níveis de aminoácidos no sangue e na urina podem ocorrer na insuficiência hepática grave, na doença tubular renal, em estados catabólicos, nas deficiências vitamínicas, na malnutrição, nas infecções, queimaduras extensas e mesmo na gravidez. Convém observar que na maioria das doenças primárias do metabolismo ou do transporte de aminoácidos as alterações nas concentrações dos mesmos são bastante significativas e múltiplas dos valores normais, o que é importante na distinção entre causas primárias

e secundárias. Enfatize-se também que elevações urinárias de um ou outro aminoácido sem concomitante alteração no plasma são geralmente devidas a tubulopatias renais adquiridas ou genéticas como já foi dito. Já o diagnóstico das acidemias orgânicas é feito em urina, pois os ácidos orgânicos possuem uma depuração renal elevada provavelmente devido à sua alta toxicidade.

A tabela 4 mostra as principais indicações para a análise de aminoácidos e ácidos orgânicos em líquidos biológicos. Por outro lado, a figura 2 mostra um protocolo para o diagnóstico das AAC e das AO.

A tabela 5 mostra os principais EIM dos aminoácidos e outros distúrbios identificados pelo aumento (ou diminuição) dos níveis plasmáticos e/ou urinários de aminoácidos.

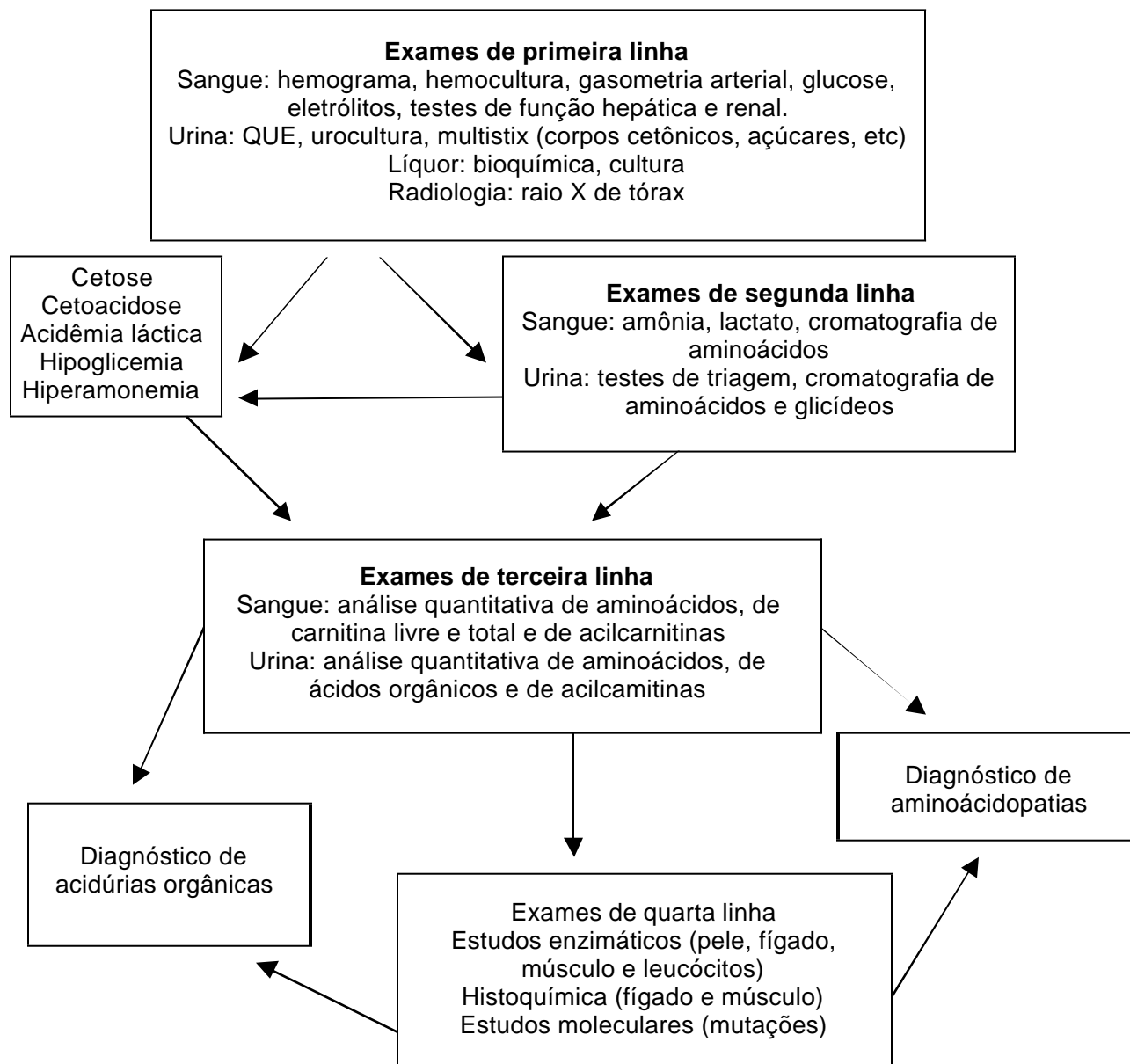
O desenvolvimento da cromatografia gasosa aplicada para a detecção de ácidos orgânicos em líquidos biológicos possibilitou a partir da segunda metade da década de 60 o diagnóstico acurado das AO e a detecção de um número crescente de novos distúrbios (11,12). A análise de ácidos orgânicos é feita por cromatografia gasosa (CG) em colunas capilares longas ou de preferência por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS) usualmente em uma amostra ocasional de urina, devendo-se dar preferência, quando

**Tabela 4.** Indicações para a determinação de aminoácidos e ácidos orgânicos nos líquidos biológicos

---

|  |
|--|
| Crise metabólica de causa desconhecida (hiperamonemia, acidose metabólica, acidemia láctica, hipoglicemia, cetonemia, cetonúria neonatal, citopenia) |
| Manifestações clínicas de intoxicação sistêmica com vômitos incoercíveis   |
| Doença neurológica de causa desconhecida   |
| Encefalopatia com convulsões   |
| Acidose metabólica persistente   |
| Hepatopatia de causa desconhecida  |
| Doença multisistêmica com sintomas progressivos  |
| Distúrbio de metabolismo energético suspeito   |
| História prévia de morte neonatal ou parente com quadro semelhante na família  |
| Consanguinidade dos pais   |
| Intolerância à proteína  |

---



**Figura 2.** Protocolo para o diagnóstico das aminoacidopatias e das acidemias orgânicas em recém-nascidos e neonatos em crise.

possível, à primeira amostra matinal, após o jejum noturno, ou a amostras colhidas durante crises de descompensação (13). Outros líquidos biológicos (soro, líquido, humor vítreo ou bile) tem pouco valor para o diagnóstico das acidemias orgânicas, mas tornam-se necessários quando do advento de morte súbita sem diagnóstico definido ou nas acidemias orgânicas com sintomas exclusivamente neurológicos sem qualquer manifestação sistêmica.

As amostras de sangue e urina para a

determinação de aminoácidos e urina para a determinação de ácidos orgânicos devem ser coletadas e imediatamente congeladas a 20 °C ou mesmo em temperaturas mais baixas quando estocada por longos períodos, visto que alguns aminoácidos e ácidos orgânicos são termoinstáveis, sendo degradados à temperatura ambiente. Quando não for possível enviar amostras de urina congeladas para a análise, colocar 2 ou 3 gotas de clorofórmio para cada 10 ml de urina. As outras amostras (soro ou líquido) não devem



**Tabela 5.** Principais erros inatos do metabolismo associados com alteração dos níveis de aminoácidos no sangue e/ou na urina

| Doença  | Aminoácido(s)                         |   |
|---|---------------------------------------|---|
|   | Sangue                                | Urina   |
| Fenilcetonúria                                | Fenilalanina ↑                        | Fenilalanina ↑  |
| Tirosinemia                                   | Tirosina ↑                            | Tirosina, outros aminoácidos neutros ↑  |
| Doença do Xarope do Bordo                     | Valina, Leucina e Isoleucina ↑        | Valina, Leucina e Isoleucina ↑  |
| Doenças do Ciclo da Uréia <sup>a</sup>        |                                       |   |
| a) Deficiência de Acetil-glutamina Sintetase  | Citrulina ↓                           |   |
| b) Deficiência de Carbamil- fosfato Sintetase | Citrulina ↓                           |   |
| c) Deficiência de Ornitina Transcarbamilase   | Citrulina ↓                           |   |
| d) Citrulinemia                               | Citrulina ↑                           | Citrulina ↑   |
| e) Acidúria Argininosucínica                  | Ácido argininosucínico ↑, Citrulina ↑ | Ácido argininosucínico ↑  |
| Hiperargininemia                              | Arginina ↑                            | Arginina ↑  |
| Hiperglicinemia não cetótica                  | Glicina <sup>b</sup> ↑                | Glicina ↑   |
| Homocistinúria                                | Metionina ↑                           | Homocistina ↑   |
| Deficiência de Cistationina Sintetase         | Metionina ↑, Homocistina ↑            | Metionina ↑   |
| Intolerância Lisinúrica à Proteína            | Lisina ↑, Glutamina ↑, Citrulina ↑    | Lisina ↑, Arginina ↑  |
| Hiperlisinemia                                | Lisina ↑                              | Lisina ↑  |
| Histidinemia                                  | Histidina ↑                           | Histidina ↑   |
| Aspartilglicosaminúria                        | Aspartilglicosamina ↑                 | Aspartilglicosamina ↑   |
| Deficiência de Creatina                       | Arginina ↓                            |   |
| Atrofia Girata                                | Ornitina ↑                            |   |
| Distúrbios da Cobalamina (CblB, CblD)         | Cistationina ↑                        | Cistationina ↑  |
| Deficiência de Cistationase                   | Cistationina ↑                        | Cistationina ↑  |
| Defeitos do Transporte de Aminoácidos         |                                       |   |
| a) Doença de Hartnup                          |                                       | Alanina ↑, Serina ↑, Treonina ↑, Glutamina ↑, Valina ↑, Leucina ↑, Isoleucina ↑, Fenilalanina ↑, Tirosina ↑, Triptofânio ↑, Histidina ↑ e Citrulina ↑ |

**Tabela 6.** Principais acidemias orgânicas diagnosticadas pelo aumento dos níveis urinários de ácidos orgânicos.

| Doença  | Ácidos orgânicos na urina  |
|---|--|
| Acidemia propiônica   | Ácido 3-hidroxipropiônico, ácido metilcítrico, ácido 3-hidroxiivalérico, propionilglicina  |
| Acidemia metilmalônica  | Ácido metilmalônico e metabólitos da acidemia propiônica   |
| Acidemia láctica  | Ácido láctico, ácido pirúvico, ácido 2-hidroxiбутírico, ácido 4-hidroxiifenilático   |
| Acidemia isovalérica  | Isovalerilglicina, ácido 3-hidroxiisovalérico, ácido 4-hidroxiisovalérico  |
| Deficiência múltipla de carboxilases                                  |  |
| Deficiência da holocarboxilase sintetase e Deficiência de biotinidase | Ácido 3-hidroxiisovalérico, 3-metilcrotonilglicina, ácido metilcítrico, ácido 3-hidroxiopropiônico, ácido láctico                      |
| Deficiência de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase                        | Ácido 3-hidroxiisovalérico, 3-metilcrotonilglicina   |
| Acidúria 3-metilglutacônica   | Ácido 3-metilglutacônico, ácido 3-metilglutárico, ácido 3-hidroxiisovalérico   |
| Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica                                   | Ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico, ácido 3-metilglutacônico, ácido 3-metilglutárico, ácido 3-hidroxiisovalérico, 3-metilcrotonilglicina |
| Acidúria glutárica tipo I   | Ácido glutárico, ácido 3-hidroxi glutárico, ácido glutacônico  |
| Acidúria glutárica tipo II  | Ácido glutárico, ácido etilmalônico, ácido adípico, ácido subérico, ácido 2-hidroxi glutárico, isovalerilglicina, isobutirilglicina    |
| Acidúria L-2-hidroxi glutárica  | Ácido L-2-hidroxi glutárico  |
| Acidúria D-2-hidroxi glutárica  | Ácido D-2-hidroxi glutárico  |
| Acidúria fumárica   | Mevalonolactona, ácido mevalônico  |
| Acidúria mevalônica   | Ácido N-acetil aspártico   |
| Doença de canavan   | Ácido D-glicérico  |
| Acidúria D-glicérica  | Ácido oxálico, ácido glicólico, ácido glioxílico   |
| Hiperoxalúria tipo I  | Ácido oxálico, ácido L-glicérico   |
| Hiperoxalúria tipo II   | Ácido 4-hidroxiбутírico, ácido 3-4-dihidroxiбутírico   |
| Acidúria 4-hidroxiбутírica  |  |

conter conservantes, devendo ser enviadas para o laboratório congeladas em volumes de 1-2 ml ou mais.

O diagnóstico correto de uma acidúria orgânica depende da identificação na urina de vários ácidos orgânicos específicos. A verificação de apenas um metabólito elevado geralmente não é muito elucidativa no diagnóstico destes distúrbios, uma vez que indica a possibilidade de vários distúrbios. Muitas vezes, um diagnóstico é somente conseguido através de análise repetitiva de amostras coletadas em períodos distintos e especialmente durante crises com descompensação metabólica, quando as concentrações dos metabólitos anormais aumentam. Outras vezes, testes de sobrecarga com substratos proximais ao bloqueio metabólito são necessários para detectar os metabólitos anormais. Por outro lado, em alguns casos a excreção urinária elevada dos metabólitos característicos não ocorre (acidúria glutárica I) e o diagnóstico só é feito pela determinação da atividade enzimática em células cultivadas (fibroblastos). Em outras situações clínicas graves, tais como em crianças severamente enfermas que não possuem acidúria orgânica, pode ocorrer aumento na excreção de vários metabólitos ácidos relacionados com hipóxia (ácidos láctico, glutárico, glutacônico, ácidos dicarboxílicos e intermediários do ciclo de Krebs). Todas essas situações devem ser bem analisadas para o sucesso do diagnóstico final. A acidemia láctica é uma característica das mitocondriopatias que serão abordadas em outro artigo. Para o caso dos defeitos de oxidação de ácidos graxos que constituem um grupo separado de acidemias, visto que os pacientes apresentam com frequência acidose metabólica, deve-se identificar os ácidos dicarboxílicos característicos na urina através de cromatografia gasosa/espectrometria de massa, bem como dos níveis séricos e teciduais de carnitina total e livre e o perfil das acilcarnitinas no sangue. Estudos sobre a oxidação de ácidos graxos e a determinação das atividades enzimáticas específicas são igualmente úteis para estabelecer-se o diagnóstico final. A tabela 6 mostra as principais acidemias orgânicas

diagnosticadas pelo aumento dos níveis urinários de vários ácidos orgânicos.

O estudo enzimático das aminoacidopatias e acidúrias orgânicas é importante para se caracterizar o defeito bioquímico e mesmo avaliar o prognóstico dos pacientes, considerando-se a atividade residual da enzima defeituosa. Neste particular, a biópsia de pele com cultivo de fibroblastos, a biópsia de fígado e de músculo esquelético por punção são importantes para a determinação das atividades enzimáticas. Para algumas formas variantes desses distúrbios, o diagnóstico definitivo só é alcançado pela análise enzimática.

Os estudos moleculares estão também disponíveis para algumas aminoacidopatias e acidúrias orgânicas e são feitos através da detecção de mutações específicas. São particularmente úteis para confirmar o diagnóstico de algumas destas entidades onde o diagnóstico bioquímico ou enzimático não pode ser feito (ex., defeitos de receptores ou proteínas de membrana, ocasional em acidúria glutárica tipo I), ou em doenças que se caracterizam por mutações preponderantes, para o diagnóstico das doenças mitocondriais com acidemia láctica associada, para avaliar o prognóstico em algumas acidúrias com correlação genótipo/fenótipo definida, para estudos familiares e para o diagnóstico pré-natal.

Em algumas ocasiões, a criança afetada morre sem definição do diagnóstico da doença neurometabólica suspeita. Nestes casos, é essencial coletar amostras postmortem para o esclarecimento diagnóstico e posterior aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal. Os estudos mais importantes nestas situações são a determinação quantitativa de aminoácidos no plasma e líquido céfaloraquidiano, a determinação de ácidos orgânicos na urina e de acilcarnitinas em plasma, urina ou papel de filtro impregnado com sangue ou plasma, bem como estudos enzimáticos e moleculares em sangue, biópsias de pele e/ou fígado.

O diagnóstico laboratorial completo dos EIM não pode ser feito exclusivamente pela análise de aminoácidos e ácidos orgânicos, visto que muitas dessas doenças fazem

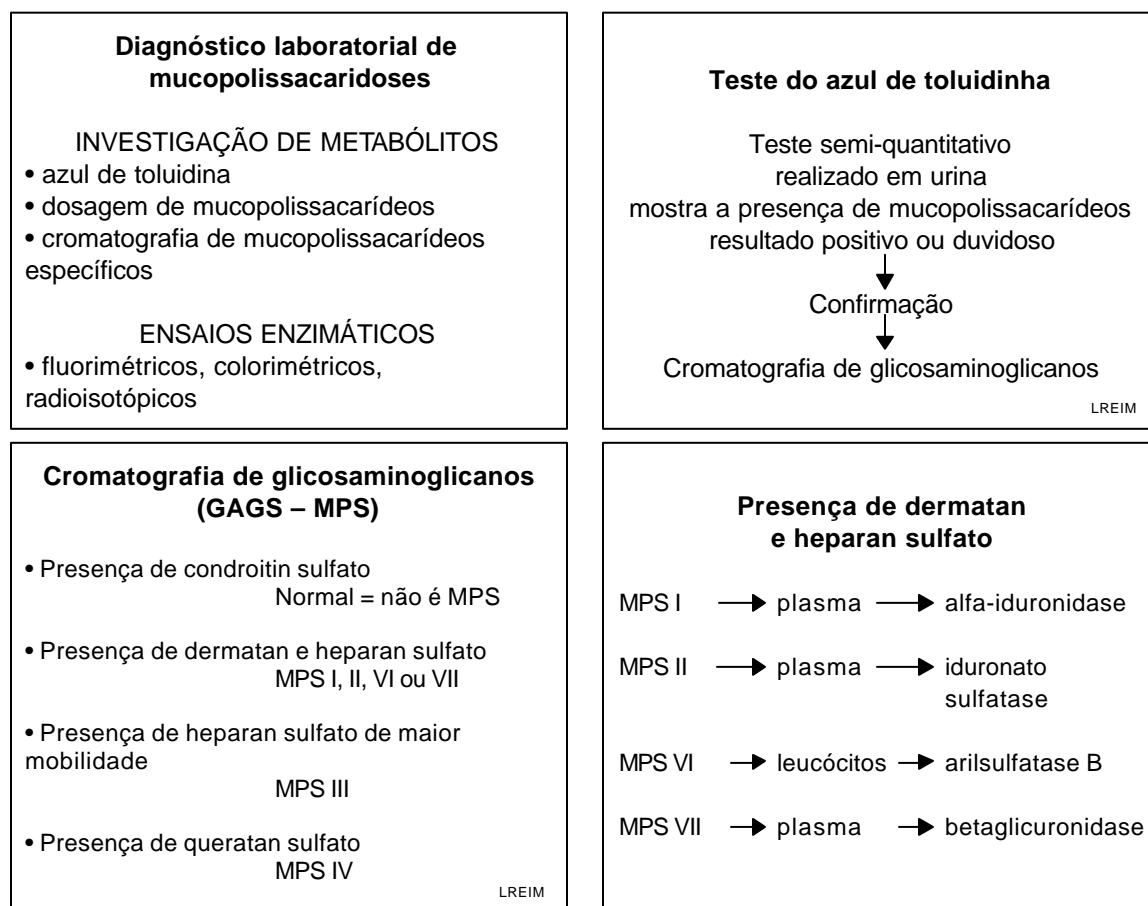
parte do metabolismo de outras moléculas, tais como dos nucleotídeos e das glicoproteínas. Nestas, geralmente ocorre o acúmulo extracelular de outros compostos ou intracelular de moléculas complexas. Devido à destruição das células provocadas por esse acúmulo nas doenças de depósito, essas substâncias podem ser analisadas no plasma e especialmente na urina.

As bases púricas e pirimídicas são constituintes do DNA e do RNA. Defeitos no metabolismo desses compostos levam a EIM caracterizados geralmente por sintomatologia neurológica severa (convulsões intratáveis) no infante ou mesmo gota no adulto. Outros sinais clínicos são deficiência imunológica e insuficiência renal associada à cálculos renais. A investigação diagnóstica para esses casos leva em conta a relação creatinina/ácido úrico que pode estar aumentada ou diminuída e a análise de derivados púricos e pirimídicos por HPLC.

### **Doenças de depósito ou de moléculas complexas**

Como enfatizamos anteriormente, os testes de triagem descritos na tabela 1 e a cromatografia de aminoácidos detectam a quase totalidade das aminoacidopatias, além de direcionar a investigação para as acidemias orgânicas e as principais doenças do metabolismo de glicídios (galactosemia, glicosúria renal e intolerância à frutose). As doenças lisossômicas de depósito (DLD), quando suspeitas, necessitam ser avaliadas por protocolos especiais que identifiquem os compostos acumulados. Os principais sinais sugestivos de doenças de organelas encontram-se na tabela 2.

O protocolo inicial de investigação das DLD inclui o teste do azul de toluidina (para mucopolissacaridoses), bem como as cromatografias de oligossacarídios (OLS) e sialoligossacarídios (SOLS) e a medida das atividades das enzimas plasmáticas beta-glicuronidase e hexosaminidases A e B (14).



**Figura 3.** Diagnóstico de mucopolissacaridoses

Ao conjunto desses testes associados aos testes de triagem simples costumamos designar de triagem para doenças de depósito ou simplesmente de triagem ampliada.

A figura 3 mostra o procedimento laboratorial para o diagnóstico das mucopolissacaridoses. O teste do azul de toluidina é simples e consiste na detecção de glicosaminoglicanos (GAGs) presentes na urina do paciente. Caso estes compostos estiverem em excesso, reagirão com o reagente azul de toluidina e formarão uma mancha azul escura não removível por ácido acético no papel de filtro onde foi colocada uma gota de urina. Isso indica a possibilidade de uma mucopolissacaridose (MPS). O passo a seguir é uma cromatografia em camada delgada para análise de GAGs, que indicará o padrão qualitativo de excreção destes compostos. Conforme esse padrão, especialmente no que se refere às proporções relativas de dermatan sulfato, heparan sulfato e condroitino sulfato, pode-se pensar em uma ou outra mucopolissacaridose. A urina normal contém condroitino sulfato e pequenas quantidades de dermatan e heparan sulfato.

Finalmente, associando-se as características clínicas e os dados familiares, procede-se a ensaios enzimáticos específicos para se chegar a um diagnóstico definitivo de mucopolissacaridose.

Por outro lado, as cromatografias de OLS e SOLS realizadas em camada delgada detectam bandas correspondentes a oligossacarídeos que são o produto da degradação incompleta de cadeias laterais de glicoproteínas e glicolípídeos complexos. Quando detectarem bandas anormais e padrões sugestivos de uma ou outra doença, haverá a necessidade de confirmação da DLD através da medida da atividade enzimática que é geralmente realizada em sangue ou em fibroblastos. As DLD detectadas por estas cromatografias e as enzimas a serem medidas para a confirmação diagnóstica, estão indicadas na tabela 7. Bandas anormais nessas cromatografias geralmente identificam gangliosidose GM1, galactosialidose e sialidose. Por outro lado, a urina de pacientes com b-manosidose, mucopolipidose II ou mucopolipidose III geralmente não contém excesso de oligossacarídeos, enquanto na

**Tabela 7.** Doenças detectadas nas cromatografias de oligossacarídeos e sialiloligossacarídeos, e respectiva deficiência enzimática

| EIM detectado   | Enzima deficiente  |
|---|--|
| Gangliosidose GM1   | b-galactosidase  |
| Doença de Sandhoff  | Hexosaminidases A e B  |
| a-Manosidose  | a-manosidase   |
| b-Manosidose  | b-manosidase   |
| Fucosidose  | a-fucosidase   |
| Sialidose (Mucopolipidose I)                                  | neuraminidase  |
| Aspartilglicosaminúria  | aspartilglicosaminidase  |
| Galactosialidose  | neuraminidase e b-galactosidase<br>(deficiência da proteína protetora)     |
| Doença infantil de acúmulo de ácido siálico e Doença de Salla | acúmulo de ácido n-acetil-neuramínico por defeito de transporte lisossomal |

**Tabela 8.** Alguns EIM não detectados pela triagem na urina nem pelo protocolo para detecção de DLD, mas que podem ser detectados através da dosagem enzimática específica realizada em laboratórios de referência

| EIM                                | Enzima deficiente  |
|------------------------------------|--|
| Leucodistrofia Metacromática       | Arilsulfatase A  |
| Doença de Gaucher                  | b-glicosidase (glicocerebrosidase)                               |
| Doença de Krabbe                   | Galactocerebrosidase   |
| Doença de Niemann-Pick tipos A e B | Esfingomielinase   |
| Doença de Fabry                    | a-galactosidase  |
| Glicogenoses                       | várias enzimas   |
| Ictiose ligada ao X                | Arilsulfatase C  |
| Deficiência múltipla de sulfatases | Sulfatases<br>(confirmar deficiência de pelo menos 2 sulfatases) |

alfa-manosidose, alfa-fucosidose, doença de Sandhoff ou aspartilglucosaminuria a presença desses compostos é variável.

Quando a atividade das enzimas beta-glicuronidase e hexosaminidases A e B estiverem acima da normalidade em plasma, podemos estar frente a um paciente com mucopolidose II ou III. Neste caso, outras enzimas lisossômicas deverão ser medidas no plasma para a confirmação diagnóstica. Já a diminuição da atividade da beta-glicuronidase indica a possibilidade de MPS tipo VII, enquanto uma baixa atividade de hexosaminidase A sugere doença de Tay-Sachs e a diminuição tanto de hexosaminidase A quanto de B juntas indica doença de Sandhoff.

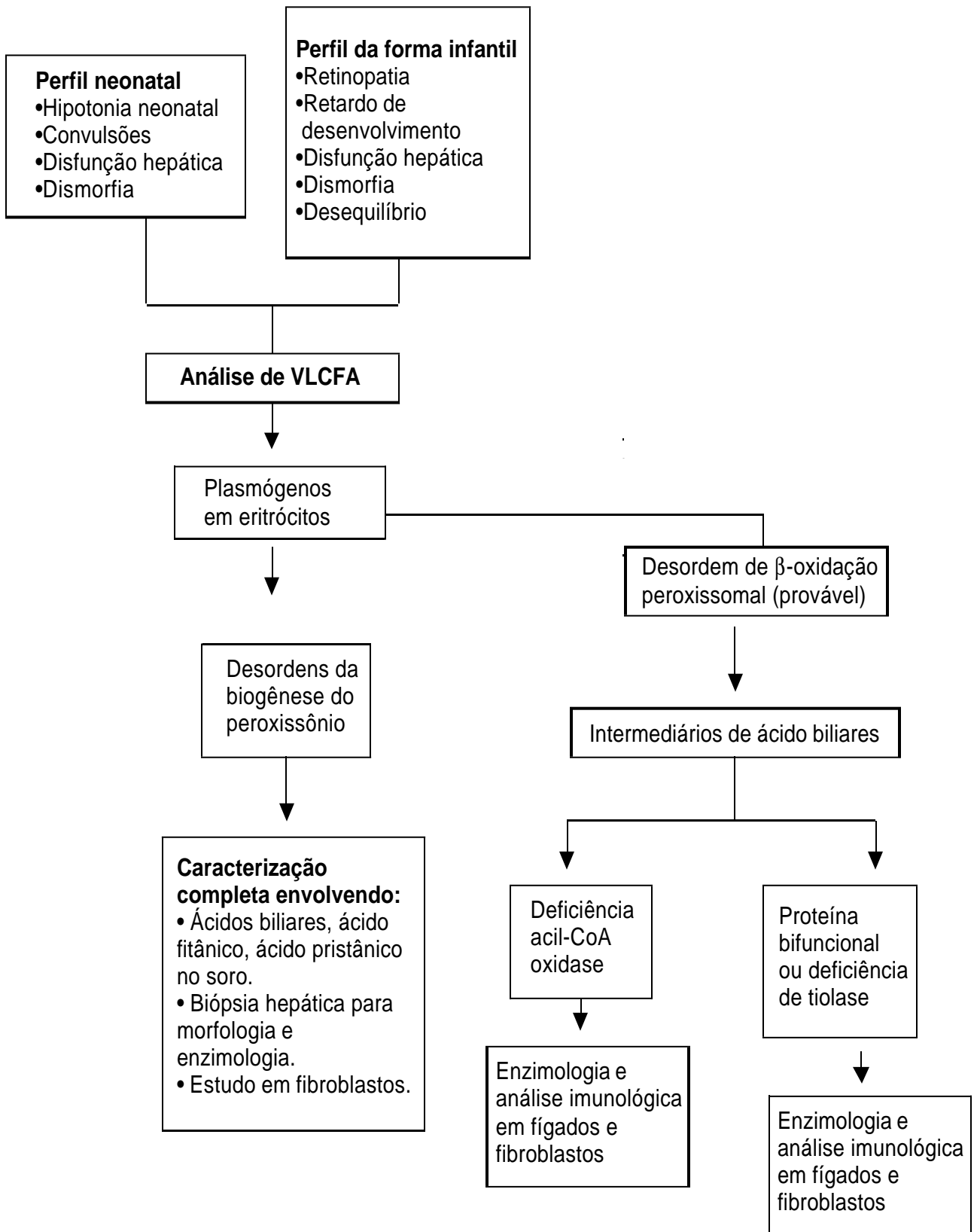
Embora os protocolos supracitados abrangam uma gama muito grande de doenças metabólicas, algumas delas não são detectadas (tabela 8). É o caso, por exemplo, da doença de Gaucher e da leucodistrofia metacromática, que necessitam que o médico faça a suspeita e sugira os ensaios enzimáticos específicos em leucócitos ou fibroblastos, sem necessidade de passar pelos protocolos já citados. Além disso, aconselha-se que, na presença de uma suspeita clínica elevada, o médico solicite novos exames para a possibilidade diagnóstica aventada.

### ***Desordens peroxissomais***

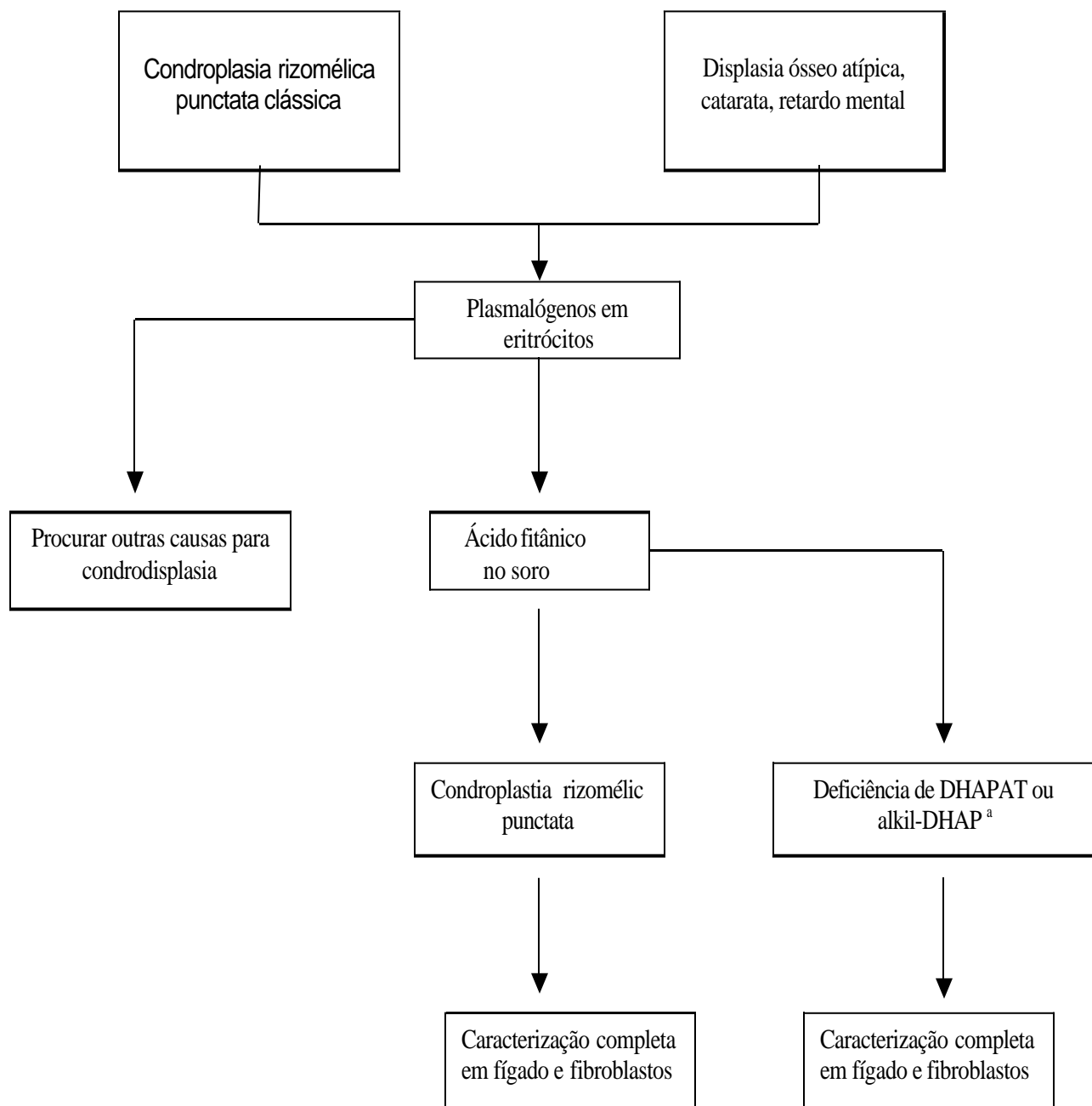
Ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA), definidos como ácidos graxos saturados com 22 carbonos ou mais, estão em excesso na maioria das desordens peroxissomais (15). Portanto, a detecção do aumento dos níveis destas substâncias em líquidos biológicos é o método mais utilizado para a identificação destas doenças. As enzimas peroxissomais catalizam passos essenciais da degradação de ácidos graxos, ácido piperólico, glioxalato e da síntese de ácidos biliares, esterres fosfolipídicos e isoprenóides (16). Protocolos laboratoriais para a investigação de desordens da biogênese do peroxissoma e da b-oxidação peroxissomal já estão bem estabelecidos (figuras 4 e 5)

Sangue venoso é amostra de primeira escolha na investigação das desordens peroxissomais, uma vez que vários metabólitos mostram-se aumentados em plasma ou soro.

A dosagem plasmática de VLCFA deve ser feita em todos os casos de suspeita de doenças peroxissomais, procedendo-se a uma extração dos ácidos graxos no plasma com posterior remoção das proteínas precipitadas, remoção de lipídios polares,



**Figura 4.** Protocolo para investigação das desordens da biogênese dos peroxissomais e de β-oxidação peroxissomal.



**Figura 5.** Protocolo para investigação de condrodissplasia rizomélica punctata e distúrbios relacionados

<sup>a</sup> alquil-dihidroxiacetona-fosfato sintetase

esterificação dos lipídios totais, purificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos por cromatografia em camada delgada e quantificação dos mesmos por cromatografia gasosa (17). Um aumento importante na concentração do ácido hexacosanóico (C26:0) no plasma é encontrado na

adrenoleucodistrofia ligada ao X (X-ALD), assim como na razão desta concentração para aquela do ácido docosanóico (C22:0), quando comparados aos valores de referência. Além do C26:0 outros metabólitos encontram-se aumentados em diferentes doenças peroxissomais (tabela 9).



**Tabela 9.** Determinação de ácidos graxos de cadeia muito longa

| Desordem   | C26:0<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | THCA<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | Fitânico<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | Pristânico<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | Plasmalógenos<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) |
|--|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| Desordens da biogênese do peroxissomo              | ↑                              | ↑                             | ↑                                 | ↑                                   | ↓                                      |
| Condrodisplasia rizomérica clássica e não clássica | n                              | n                             | ↑                                 | n                                   | ↓                                      |
| Síndrome Zellweger                                 | ↑                              | ?                             | ?                                 | ?                                   | ↓                                      |
| X-ALD, forma infantil e variantes                  | ↑                              | n                             | n                                 | n                                   | n                                      |
| Deficiência da acil-CoA oxidase                    | ↑                              | n                             | n                                 | n                                   | n                                      |
| Proteína bifuncional e deficiência de tiolase      | ↑                              | ↑                             | ↑                                 | ↑                                   | n                                      |
| Desordens de síntese de ésteres de fosfolípidos    | n                              | n                             | n                                 | n                                   | ↓                                      |

(14)

## Referências

1. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Inc; 2001.
2. Fernandes J, Saudubray JM, Ogier Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment. 3<sup>rd</sup> ed. Berlin: Springer Verlag; 2000.
3. Hommes FA. Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics 1<sup>st</sup> ed. New York: Wiley-Liss Inc; 1991.
4. Blau N, Duran M, Blaskovics ME. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Disease. 1<sup>st</sup> ed. London: Chapman and Hall; 1996.
5. Ersser RS and Smith I. Aminoacids and Related Compounds In: Smith I and Seakins IWT. Chromatographic and Eletrophoretic Techniques. 4<sup>st</sup> ed. London: William Heinemann Medical Books Ltd; 1976.
6. Joseph MH and Marsden CA. Amino acids and small peptides. In: Lim CK, editor. HPLC of small molecules. 1<sup>st</sup> ed. Oxford: IRL Press; 1986. p. 13-28.
7. Chalmers RA, Purkiss P, Watts RWE, Lawson AM. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. J Inher Metab Dis 1980;3:27-9.
8. Hoffmann G. Organic acid analysis. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, editors. Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic disease. 1<sup>st</sup> ed. London: Chapman and Hall; 1996. p. 31-49.
9. Chalmers RA, Lawson AM. Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. 1<sup>a</sup> ed. London: Chapman and Hall; 1982.
10. Rashed M, Ozand PT, Aqeel A, Gascon GG. Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with organic acid disorders.

- Brain Develop 1994;16(Suppl):1-6.
11. Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher, Isovalericacidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. Proc Natl Acad Sci USA 1966;56:236-9.
  12. Buchanan DN and Thoene HG. Volatile organic acid profiling in physiological fluids using gas chromatography/mass spectrometry. In: Hommes FA, editor. Techniques in diagnostic human biochemical genetics 1<sup>st</sup> ed. New York: Wiley-Liss Inc; 1991 p. 133-41.
  13. Sweetmann L. Organic acid analysis. In: Hommes FA, editor. Techniques in diagnostic human biochemical genetics. A laboratory manual. 1<sup>st</sup> ed. New York: Wiley-Liss; 1995. p. 143-76.
  14. Barth ML, Giugliani R, Goldenfum SL, Munarki R, Folberg A, Lekhwani C, et al. Application of a flowchart for the detection of lysosomal storage diseases in 105 high risk Brazilian patients. Am J Med Gen 1990;37:534-8.
  15. Fournier B, Smeitink JAM, Dorland L, Berger R, Saudubray JM, Poll-The BT. Peroxisomal Disorders: A Review. J Inher Metab Dis 1994;17:470-86.
  16. Wanders RJA, Rudd BH, Schutgens Barth PG. Peroxisomal Disorders In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, editor. Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic disease. 1<sup>st</sup> ed. London: Chapman and Hall; 1996. p.359-76.
  17. Moser HW, Moser A. Measurement of saturated very long chain fatty acids in plasma. In: Hommes FA, editor. Techniques in diagnostic human biochemical genetics 1<sup>st</sup> ed. New York: Wiley-Liss Inc; 1991. p.177-91.