



ARTIGO ORIGINAL

Aplicação de um protocolo clínico-laboratorial para identificação de erros inatos do metabolismo em crianças gravemente enfermas

Application of a clinical and laboratorial protocol of investigation of inborn errors of metabolism among critically ill children

Maria T.V. Sanseverino¹, Moacir Wajner^{1,2}, Roberto Giugliani^{1,3}

Resumo

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi aplicar um protocolo para a investigação de Erros Inatos do Metabolismo (EIM) em crianças gravemente enfermas.

Métodos: Trata-se de um estudo transversal envolvendo 46 crianças com suspeita de um distúrbio metabólico, selecionadas, ao longo de dois anos, a partir de solicitações de investigação de EIM procedentes de Unidades de Tratamento Intensivo pediátricas ou neonatais da região metropolitana de Porto Alegre. Foram incluídos pacientes que apresentavam uma ou mais das seguintes alterações clínicas, sem etiologia definida: acidose metabólica, desequilíbrio hidroeletrólítico, hipoglicemia, convulsões, alteração de consciência, alteração hepática ou história familiar sugestiva de um EIM. O protocolo constou de avaliação clínica, testes obrigatórios (realizados em todos os pacientes) e testes opcionais (realizados seletivamente de acordo com o resultado dos primeiros ou a partir de uma hipótese clínica específica).

Resultados: Foram identificados 6 casos de EIM nos 46 pacientes investigados (13%): galactosemia clássica, hiperglicinemia não cetótica, acidúria propiônica, acidúria isovalérica, acidúria 3-hidroxi-3-metil-glutárica e deficiência de 2-metil-acetoacetilCoA tiolase. Assim, a frequência de acidúrias orgânicas neste grupo foi de 4/46 (8,7%).

Conclusões: A frequência de acidúrias orgânicas justifica a inclusão da pesquisa de ácidos orgânicos entre os exames de primeira linha nas crianças com quadros agudos e graves sem etiologia definitiva. A frequência relativamente elevada de EIM, numa proporção comparável à observada em outros estudos em grupos de alto risco, indica que o protocolo é eficiente e justifica a investigação sistemática de EIM em crianças com quadros agudos e graves sem etiologia claramente definida.

J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76(5):375-382: erros inatos de metabolismo, acidúrias orgânicas, aminoacidopatias, hiperamonemia, galactosemia.

Abstract

Objective: The aim of this work was to evaluate a protocol for investigation of Inborn Errors of Metabolism (IEM) in children who are acutely ill.

Methods: Forty six children with clinical suspicion of a metabolic disorder were studied during 2 years. They were selected through request for investigation of IEM from Pediatrics or Neonatal Intensive Care Units located in the metropolitan area of Porto Alegre. Criteria for inclusion were presence of one or more of the following clinical alterations, without defined etiology: Metabolic acidosis, electrolyte disturbances, hypoglycemia, seizures, lethargy, liver dysfunction, family history suggestive of IEM. The protocol included clinical evaluation, compulsory tests (performed in all patients) and optional tests (performed selectively according to the results from the first tests or through specific clinical hypothesis).

Results: Six cases of IEM were identified: galactosemia, non-ketotic hyperglycinaemia, propionic acidemia, isovaleric acidemia, 3-hydroxy-3-methylglutaric acidemia and deficiency of 3-ketothiolase deficiency.

Conclusions: The frequency of organic acidurias in this group was 4/46 (8.7%), which justifies the inclusion of organic acids analysis among the first line exams in acutely and severely ill children with undefined etiology. The relatively high frequency of IEM (6/46 or 13%), which is comparable to the ones observed in other studies within high risk groups, indicates that the protocol suggested is efficient and justifies the systematic investigation of IEM in not explained critically ill children.

J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76(5):375-382: inborn errors of metabolism, organic acidurias, aminoacidopathies, hyperammonemia, galactosemia.

1. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2. Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3. Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Este trabalho é parte da Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Introdução

Os EIM são distúrbios monogênicos, em sua maioria com padrão de herança autossômica recessiva, portanto com 25% de possibilidade de recorrência para irmãos do afetado. Alguns EIM apresentam padrão de herança autossômico dominante, como a hipercolesterolemia familiar, e outros EIM apresentam um padrão de herança ligada ao cromossoma X, como a doença de Fabry e a deficiência de ornitina transcarbamilase¹.

Os EIM formam um grupo heterogêneo de mais de 500 patologias originadas a partir de uma alteração no material genético que determina defeito ou ausência de uma proteína, geralmente uma enzima, e prejuízo da sua função metabólica².

Muitos EIM se apresentam precocemente, frequentemente já no período neonatal. Os principais grupos de EIM com apresentação aguda e grave na infância incluem: *defeitos no metabolismo de carboidratos*, p.ex: galactosemia clássica; *defeitos no ciclo da uréia*, p.ex: deficiência de ornitina transcarbamilase; *acidúrias orgânicas*, p.ex: acidúria propiônica; *aminoacidopatias*, p.ex.: hiperglicinemia não cetótica; *defeitos no metabolismo de ácidos graxos*, p.ex.: deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média³.

Os avanços recentes no diagnóstico e o tratamento dos erros inatos de metabolismo (EIM) melhoraram significativamente o prognóstico para muitas dessas doenças. Assim, é essencial que o pediatra esteja familiarizado com a apresentação clínica dessas desordens, com a investigação laboratorial mais adequada, com o melhor manejo de emergência para estabilização dos pacientes gravemente doentes e com a identificação daquelas crianças que podem se beneficiar de avaliação e tratamento específicos^{4,5}.

Embora individualmente raras, a frequência conjunta de EIM em grupos pré-selecionados como de alto risco pode ser até 200 vezes superior à identificada na população em geral⁶. Por exemplo, em um estudo de Arens e colaboradores (1993) realizado no *Childrens Hospital Los Angeles* com 166 crianças encaminhadas para investigação metabólica por apnéia foram encontrados 7 casos de EIM (4,2%)⁷. Estima-se que um laboratório experiente que conte com a colaboração de um pediatra especializado obtenha o diagnóstico de um EIM em aproximadamente 6% dos casos referidos⁸. Em um levantamento anterior de nosso laboratório de referência para diagnóstico de EIM, foram investigados 10.000 pacientes selecionados a partir da suspeita clínica, sendo diagnosticados 647 casos (6,5%) de EIM⁹.

A Tabela 1 apresenta manifestações clínicas que sugerem um EIM, quando não há outra etiologia definida¹⁰.

Diversos fatores contribuem para dificultar o diagnóstico de um EIM, entre eles o grande número de distúrbios, a diversidade dos defeitos envolvidos, e a ausência de sinais e sintomas específicos na maioria dos casos¹⁰.

Tabela 1 - Características que na ausência de uma etiologia clara sugerem a presença de um EIM (Giugliani, 1988)

-
1. Recém-nascido apresentando coma, hipotonia, irritabilidade, convulsões, acidose, distúrbio hidroeletrólítico, sepsis, hipoglicemia, icterícia, vômitos ou diarreia.
 2. Retardo no desenvolvimento neuromotor e/ou deficiência mental.
 3. Regressão neurológica com perda de habilidades anteriormente adquiridas.
 4. Hepato e/ou esplenomegalia, icterícia colestática ou diarreia crônica.
 5. Deficiência de crescimento e/ou alterações ósteo-articulares.
 6. Episódios recorrentes de hipoglicemia, acidose metabólica, desequilíbrio hidroeletrólítico.
 7. Relato de irmão falecido precocemente sem diagnóstico definido.
 8. Consangüinidade entre os pais.
-

As técnicas necessárias para o diagnóstico de um EIM incluem desde testes metabólicos simples na urina e no plasma até ensaios enzimáticos e análise de DNA em leucócitos, fibroblastos cultivados ou outros tecidos. Com exceção dos testes simples, o restante da investigação está usualmente concentrada em laboratórios de referência. A maneira mais eficiente de sistematizar a investigação de um EIM é dirigi-la de acordo com a forma de apresentação clínica, aguda ou crônica¹¹.

Assim, considerando as dificuldades técnicas e os custos envolvidos, torna-se importante o adequado direcionamento da investigação laboratorial a partir dos principais achados clínicos e laboratoriais. Com o objetivo de sistematizar a investigação de EIM em situações graves e agudas no período neonatal e na infância e otimizar os diagnósticos, foi elaborado e aplicado um protocolo de investigação dirigido ao diagnóstico de EIM em crianças com quadros agudos e graves.

Métodos

Amostra estudada

A amostra foi selecionada a partir de casos encaminhados para investigação metabólica no Laboratório Regional de EIM do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), procedentes de Unidades de Tratamento Intensivo pediátrica ou neonatal da região metropolitana de Porto Alegre, RS. Foram estudadas 46 crianças que apresentavam uma ou mais das seguintes anormalidades, sem etiologia definida: a) acidose metabólica; b) hipoglicemia; c) desequilíbrio hidroeletrólítico; d) convulsões; e) alteração no nível de consciência; f) altera-

ção hepática aguda; g) história familiar sugestiva de um EIM na presença de um quadro grave e inexplicado. Na Tabela 2, está indicado o principal motivo da investigação, devendo ser ressaltado que muitos pacientes apresentavam mais de um motivo.

Tabela 2 - Distribuição da amostra quanto à principal alteração clínica ou laboratorial que motivou a investigação

Motivo do Encaminhamento	Nº de pacientes	%
Crises convulsivas	15	32,6
Acidose metabólica	8	17,4
Alteração do nível de consciência	7	15,2
Hipoglicemia	6	13,0
Alteração hepática aguda	6	13,0
História familiar sugestiva de um EIM	3	6,5
Desequilíbrio hidroeletrólítico grave	1	2,2
Total	46	100

Observação: vários pacientes apresentavam mais de um dos sinais acima expostos. Nestes casos, a manifestação clínica ou laboratorial mais importante foi considerada.

Protocolo

A elaboração do protocolo para investigação de doenças metabólicas aplicado nestes pacientes baseou-se em vários estudos já publicados a respeito da investigação de EIM em crianças gravemente enfermas^{3,12-20} adaptados à disponibilidade de recursos e às facilidades de referência do laboratório que sediou o estudo. O protocolo de investigação aplicado está explicado na Tabela 3.

Coleta de material

Foram coletados de todos os pacientes 3 ml de sangue em seringa heparinizada (para dosagem de amônia e cromatografia de aminoácidos) e 2 ml de sangue precipitados imediatamente em 4 ml de ácido perclórico gelado (para dosagem de lactato), transportados ao laboratório em banho de gelo, para centrifugação. Foram também coletados de cada paciente em torno de 30 ml de urina ocasional. De acordo com as alterações laboratoriais detectadas, foram coletadas novas amostras de sangue, urina ou pele para completar a investigação.

Resultados

Dos 46 pacientes estudados, 28 (60,9%) eram do sexo masculino e 18 (39,1%) eram do sexo feminino. Quanto à

Tabela 3 - Protocolo aplicado para a detecção de EIM em crianças agudamente enfermas

Informação clínica: registros relativos à idade, motivo da avaliação, quadro clínico, história familiar, aspectos nutricionais, medicamentos em uso, exame físico.

1. Testes obrigatórios: realizados em todos os pacientes.

- 1.1 Testes de triagem para EIM na urina:
 - a) Reação de Benedict (*açúcares redutores*)
 - b) Reação de Cloreto férrico (*metabólitos de fenilalanina e tirosina*)
 - c) Reação de Dinitrofenilhidrazina (*cetoácidos*)
 - d) Reação de Nitrosoaftol (*metabólitos da tirosina*)
 - e) Reação do Cianeto-nitroprussiato (*grupos sulfidrila*)
 - f) Reação de para-nitroanilina (*ácido metilmalônico*)
- 1.2 Determinação de creatinina na urina
- 1.3 Cromatografia de aminoácidos em sangue e urina
- 1.4 Dosagem de lactato e piruvato no sangue
- 1.5 Dosagem de amônia no plasma

2. Testes opcionais: realizados de acordo com uma suspeita clínica específica ou a partir de alterações nos testes obrigatórios.

- 2.1 Cromatografia em camada delgada de glicídios na urina
- 2.2 Dosagem colorimétrica de ácido orótico na urina
- 2.3 Análise quantitativa de aminoácidos no plasma e na urina
- 2.4 Cromatografia gasosa para pesquisa de ácidos orgânicos na urina
- 2.5 Dosagem de 17-OH-progesterona

3. Outros testes: por exemplo, dosagem enzimática ou análise molecular, a partir de anormalidades específicas detectadas nos procedimentos anteriores.

idade, a maioria dos pacientes estava no primeiro ano de vida (37 pacientes ou 80,5%), sendo 13 recém-nascidos (28,3%).

As alterações neurológicas agudas motivaram a investigação metabólica em 22 pacientes (47,8%) e estavam presentes em todos os pacientes que tiveram o diagnóstico definitivo de um EIM (Tabela 2).

Em seis dos 46 pacientes (13%) investigados, foi identificado um EIM. O grupo de EIM mais freqüente em nossa amostra foi o das acidúrias orgânicas, correspondendo a 4 dos 6 casos de EIM detectados (Tabela 4).

Em 23 casos (50%), foi estabelecido o diagnóstico de uma patologia não metabólica que justificava as anormalidades clínicas que motivaram a investigação de um EIM. O diagnóstico mais freqüente foi de infecção congênita ou adquirida (13 casos).

Tabela 4 - Erros inatos do metabolismo diagnosticados na amostra estudada

Acidemia propiônica
Acidúria isovalérica
Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica
Deficiência de 3-cetotiolase
Galactosemia clássica
Hiperglicinemia não cetótica

Em 17 casos (36,9%), não foi possível estabelecer com certeza a etiologia dos distúrbios que levaram à investigação de um defeito metabólico. Em pelo menos 12 casos (26,8%), permaneceu a suspeita de um EIM subjacente não identificável pelas técnicas empregadas.

Os principais achados clínicos e laboratoriais dos 6 casos em que um EIM foi diagnosticado são resumidos brevemente a seguir.

Caso 9: paciente masculino, branco, encaminhado para investigação metabólica aos 12 dias de vida por apresentar crises convulsivas e coma. Foi o quinto filho de pais consanguíneos, primos em 1º grau, que tiveram outros dois filhos falecidos no período neonatal com quadro semelhante. Com 48 horas de vida, internou na UTI neonatal apresentando dificuldade respiratória, vômitos incoercíveis. Com 12 dias, iniciou com crise convulsivas, evoluindo para parada respiratória e coma, sendo colocado em ventilação mecânica. Apresentava acidose metabólica severa persistente. A aplicação do protocolo mostrou hiperamonemia (12,1 mcg/ml – normal até 2), aumento de glicina e prolina na cromatografia de aminoácidos em sangue e urina. A pesquisa de ácidos orgânicos na urina evidenciou níveis elevados de ácido hidroxi-propiônico, propionilglicina e metilcitrato. Paciente evoluiu ao óbito aos 14 dias de vida. *Conclusão:* acidemia propiônica.

Caso 19: paciente encaminhada para investigação metabólica aos 2 meses de vida por sepsis, catarata, hepatoesplenomegalia e icterícia. Na aplicação do protocolo, obteve-se reação de Benedict positiva e presença de galactose na cromatografia de glicídios na urina. A dosagem de amônia e de lactato foram ligeiramente elevadas. A deficiência de galactose-1-fosfato-uridil-transferase foi confirmada em eritrócitos; os pais apresentavam níveis de atividade enzimática compatíveis com os de heterozigotos. A paciente foi acompanhada no serviço de Gastroenterologia Pediátrica do HCPA, evoluindo com retardo neuropsicomotor severo e cegueira; a família era de baixo nível socioeconômico com dificuldade de adesão ao tratamento. *Conclusão:* galactosemia clássica.

Caso 20: paciente é o segundo filho de um casal não consanguíneo, encaminhado aos 2 anos de idade para investigação de EIM por episódios de acidose metabólica e alteração do sensorio, na presença de infecção, sem correlação com o quadro clínico. Nos exames obrigatórios de protocolo, obteve-se uma reação de para-nitroanilina duvidosa, normal na repetição, e a presença de glicina na cromatografia de aminoácidos na primeira amostra de urina (durante a crise). A pesquisa de ácidos orgânicos na urina mostrou a presença de níveis elevados de 3-hidroxi-butirato, acetoacetato, 3-hidroxi-3-metil-butirato, tigilglicina e 3-hidroxi-isovalerato, compatíveis com a deficiência da enzima mitocondrial 3-acetoacetyl-CoA tiolase (3-cetotiolase). As atividade da enzima em fibroblastos estava ausente, confirmando o diagnóstico. Os pais apresentavam níveis de atividade enzimática compatíveis com os de heterozigotos. O estudo molecular revelou a presença de uma mutação específica²¹. O paciente está sendo acompanhado no serviço de Genética do HCPA, recebendo dieta hipoprotéica (1,5 a 2g de proteína/kg/dia), com desenvolvimento físico e neuropsicomotor adequados. *Conclusão:* deficiência de 3-cetotiolase.

Caso 24: paciente encaminhado para investigação por crises convulsivas e insuficiência respiratória no período neonatal. Nos exames complementares apresentava acidose metabólica persistente e leucopenia severa. A aplicação do protocolo mostrou várias alterações inconclusivas; a pesquisa de ácidos orgânicos na urina, realizada retrospectivamente, evidenciou níveis elevados de isovalerilglicina e ácido isovalérico. Aos 6 meses de vida, paciente reinternou com extensa broncopneumonia, sepsis, acidose metabólica severa, leucopenia; apresentava retardo neuropsicomotor severo; evoluiu ao óbito poucas horas após. *Conclusão:* acidúria isovalérica.

Caso 32: paciente encaminhado para investigação com 1 ano e 9 meses, por apresentar episódios recorrentes de hipoglicemia e alteração do sensorio na presença de acidose metabólica severa. A cromatografia de aminoácidos mostrou a presença de valina, leucina e isoleucina em uma primeira amostra de sangue, sendo normal na repetição. A pesquisa de ácidos orgânicos na urina mostrou níveis elevados de ácido 3-hidroxi-3-metil-glutárico e aumento de ácido 3-metilglutárico. A atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coA liase em fibroblastos estava ausente, confirmando o diagnóstico. O paciente está em acompanhamento no HCPA, mantendo dieta restrita em proteínas e lipídios e rica em carboidratos, com intervalos frequentes de administração. *Conclusão:* acidúria 3-hidroxi-3metil glutárica.

Caso 41: paciente encaminhada para investigação por coma e crises convulsivas no período neonatal, de causa desconhecida. A cromatografia de aminoácidos mostrou aumento de glicina no sangue e na urina. A pesquisa de

ácidos orgânicos na urina foi normal. A análise quantitativa de aminoácidos evidenciou níveis elevados de glicina na urina, sangue e líquido, este último apresentando concentrações bastante elevadas. Até os 3 meses de vida a criança evoluiu razoavelmente. O seguimento do caso foi então perdido. *Conclusão*: hiperglicinemia não-cetótica.

Discussão

O diagnóstico de um EIM depende principalmente da suspeita clínica e das adequadas solicitação e realização dos exames complementares. O estabelecimento de protocolos de investigação para determinados grupos de EIM tem se mostrado importante para o diagnóstico mais eficiente dessas patologias²².

Diversos trabalhos têm apontado as principais características clínicas e laboratoriais que levam à suspeita de um EIM em crianças com quadros agudos, bem como a melhor maneira de investigá-los^{9,11-20}. Os sintomas típicos incluem letargia, coma, convulsões, recusa alimentar, apnéia ou taquipnéia e vômitos recorrentes. A acidose metabólica, a hipoglicemia e a hiperamonemia são também observadas em muitas dessas condições. Embora no recém-nascido estes sintomas têm usualmente levado à hipótese inicial de sepsis, os EIM devem ser adequadamente investigados em crianças com estas alterações clínicas ou laboratoriais^{3,4}.

No presente trabalho, alterações neurológicas agudas motivaram a investigação metabólica em 22 pacientes (47,8%) e estavam presentes em todos os pacientes que tiveram o diagnóstico definitivo de um EIM. Tais achados estão de acordo com a observação corrente de que a maioria dos EIM, incluindo os defeitos do ciclo da uréia, as acidúrias orgânicas e algumas aminoacidopatias se apresentam na infância com um quadro de encefalopatia aguda ou crônica⁴.

As acidúrias orgânicas são alterações do metabolismo intermediário que levam ao acúmulo de ácidos orgânicos nos tecidos, distúrbio do equilíbrio ácido-básico e alterações bioquímicas intra-celulares²³. São um grupo particularmente freqüente de EIM, estimando-se que ocorram em pelo menos 1/6.700 nascimentos²⁴. Chalmers & Lawson¹⁴ verificaram que estas patologias eram as mais freqüentes em uma população de crianças gravemente enfermas. A pesquisa de ácidos orgânicos na urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa é o exame indicado nestes casos. Atualmente este exame já está disponível em nosso meio, tendo sido identificados 63 casos entre 1.013 estudados²⁵. Nos 46 pacientes estudados no presente trabalho, foram diagnosticados 6 casos de EIM, posteriormente confirmados em laboratórios do exterior. Destes, quatro casos foram de acidúrias orgânicas: acidúria isovalérica, acidúria propiônica, deficiência de 3-cetotiolase, e acidúria 3-hidroxi-3-metil-glutárica.

Por outro lado, a identificação e a quantificação de aminoácidos são importantes para o diagnóstico e para o acompanhamento das aminoacidopatias, possivelmente o grupo mais conhecido de EIM que se manifestam no período neonatal, dos distúrbios do ciclo da uréia e da hiperglicinemia não cetótica.

A dosagem de amônia no plasma, embora tecnicamente complexa, é importante para o diagnóstico dos distúrbios do ciclo da uréia e pode estar aumentada também em outros erros do metabolismo, como as acidúrias orgânicas. Costuma ainda estar elevada em recém-nascidos com quadros graves, incluindo asfixia e infecções²⁶. Neste trabalho, a maioria dos pacientes apresentava níveis ligeiramente elevados de amônia, possivelmente relacionados à gravidade do estado clínico. No entanto, níveis significativamente elevados foram identificados apenas no paciente com acidúria propiônica.

Um número crescente de EIM pode ser adequadamente tratado, embora o prognóstico a longo prazo ainda não esteja estabelecido para muitos deles. As medidas terapêuticas habitualmente sugeridas na urgência incluem reidratação, administração de glicose, suspensão do aporte de proteínas e correção da acidose metabólica. A terapia com coquetel de vitaminas em doses altas, considerada empírica, deve ser utilizada até o estabelecimento de um diagnóstico definitivo. A remoção de metabólitos tóxicos através de procedimentos de diálise está indicada em muitos casos agudos resistentes às medidas habituais.

A investigação complementar necessária para o diagnóstico de um EIM envolve uma série de equipamentos sofisticados e procedimentos de alto custo, bem como requer investigadores experientes. Por isso, a tendência internacional tem sido o estabelecimento de centros regionais de referência e uma maior especialização dos laboratórios em determinado grupo de patologias^{9,11,29}.

Algumas vezes, os pacientes com EIM apresentam quadros muito graves e de evolução fatal. Mesmo quando um tratamento não está disponível, a identificação de um EIM é importante para o aconselhamento genético e para tornar possível o diagnóstico pré-natal em uma futura gestação²⁷. Uma orientação sobre as amostras que devem ser coletadas e enviadas a laboratórios de referência nos casos com suspeita de um EIM, mesmo quando evoluem ao óbito²⁸, está resumida na Tabela 5.

O protocolo aplicado no presente estudo mostrou-se eficiente para a detecção de EIM em crianças com quadros agudos e graves que apresentam achados sugestivos de um EIM. Nesta amostra, permitiu a detecção de 6 casos de EIM em 46 pacientes avaliados (13%), uma freqüência relativamente elevada quando comparada à de 6,5% em uma amostra geral de pacientes encaminhados para avaliação metabólica⁹.

Com base na literatura revisada e nos resultados encontrados a partir da aplicação do protocolo para a detecção de

EIM em crianças agudamente enfermas, elaboramos as seguintes conclusões e algumas recomendações:

- 1) Os testes de triagem na urina estão sujeitos a resultados “falso-positivos” (interferência de drogas e outros fatores) e “falso-negativos” (detectam um número limitado de patologias). No entanto, apresentam baixo custo e em alguns casos permitem sugerir uma investigação mais específica, como a reação de Benedict positiva no caso de galactosemia e a presença de ceto-ácidos (reação de dinitrofenilhidrazina) nas acidúrias orgânicas.

Tabela 5 - Amostras a serem coletadas em pacientes gravemente doentes com suspeita de um EIM (Giugliani, 1990)

Amostras mais importantes (sempre coletar):

1. **Urina:** 30 ml ou mais, podendo reunir diversas micções; não adicionar preservativos; manter a -20°C .
2. **Plasma ou soro:** pelo menos 3 ml e manter a -20°C ; coletar antes de transfusão sanguínea.

Amostras muito úteis (coletar sempre que possível):

1. **Sangue heparinizado:** coletar 8 a 10 ml em seringa heparinizada e conservar a 4°C (não congelar); assegurar-se de que as amostras sejam coletadas antes de transfusão de sangue; esta amostra é essencial para ensaios enzimáticos em leucócitos e eritrócitos.
2. **Biópsia de pele:** coletar sob condições estéreis e colocar em um frasco estéril, contendo meio de cultura para células (mesmo do cariótipo); em uma situação de emergência, substituir por soro fisiológico; nunca usar ágar; amostras coletadas até 24 horas após o óbito podem ser viáveis se não estiverem contaminadas; manter a 4°C .
3. **Líquor:** coletar 2 a 3 ml, centrifugar e congelar e armazenar o sobrenadante a -20°C .

Amostras úteis em situações especiais (coletar quando indicado ou quando a indicação não é clara):

1. **Sangue para análise de DNA:** coletar 10 a 20 ml de sangue total usando EDTA como anticoagulante e congelar a -20°C ; esta amostra pode ser útil para análise molecular.
2. **Amostras de tecidos:** coletar quando a suspeita diagnóstica possa ser esclarecida por estudos bioquímicos em tecidos específicos; o tecido mais útil é usualmente o fígado, mas os músculos esquelético e cardíaco também podem ser informativos; se possível, coletar 2 a 3 fragmentos por biópsia percutânea; amostras coletadas até 2 horas após o óbito são usualmente viáveis; embrulhar em papel alumínio e congelar imediatamente a -20°C ; não adicionar formol.

- 2) A cromatografia de aminoácidos no sangue e na urina é um exame semi-quantitativo bastante útil que contribui decisivamente para o diagnóstico da grande maioria das aminoacidopatias, como a hiperglicinemia não cetótica, e para a suspeita de uma acidúria orgânica a partir do aumento de glicina na urina, como na acidúria propiônica e na 2-metilcrotonil-glicinúria neste trabalho.
- 3) Níveis ligeiramente elevados de amônia são encontrados na maioria das crianças com quadros agudos e graves. Níveis significativamente elevados sugerem a presença de um defeito no ciclo da uréia, e podem estar presentes nas acidúrias orgânicas, como no paciente com acidúria propiônica.
- 4) Embora não detectada neste estudo, os níveis elevados de lactato na ausência de hipoxemia são sugestivos de uma acidemia láctica primária.
- 5) A pesquisa de ácidos orgânicos na urina, através da cromatografia gasosa com espectrometria de massa, contribui para o diagnóstico das aminoacidopatias e permite o diagnóstico definitivo de uma acidúria orgânica, como em 4 casos deste estudo. Considerando a frequência elevada destes defeitos nas crianças com quadros agudos e graves, deveria ser incluída entre os exames de primeira linha neste grupo de pacientes.
- 6) Os exames mais especializados, como ensaios enzimáticos específicos e dosagens mais complexas, devem ser reservados àqueles casos em que haja uma hipótese diagnóstica específica a partir dos achados clínicos e laboratoriais preliminares.
- 7) A avaliação clínica é fundamental para o diagnóstico definitivo de um EIM, dirigindo adequadamente a investigação. Assim, dados detalhados sobre a história clínica, história familiar, alterações laboratoriais, dieta e medicamentos em uso devem sempre ser enviados ao laboratório junto com as amostras de sangue e urina.
- 8) A frequência de EIM no grupo estudado justifica a investigação sistemática dessa condição em crianças que apresentem alguma das seguintes alterações clínicas sem uma justificativa clínica razoável: acidose metabólica severa ou recorrente, hipoglicemia, alteração de consciência, crises convulsivas, alteração da função hepática, desequilíbrio hidroeletrólítico, ou ainda em crianças com quadros agudos e graves e história familiar sugestiva de um EIM.
- 9) O acompanhamento posterior dos casos em que não foi possível afastar o diagnóstico de um EIM é importante por permitir a realização de exames adicionais de acordo com a evolução do paciente e assim ampliar a possibilidade de uma definição diagnóstica. Deve-se salientar que muitas vezes o metabólito anormal encontra-se elevado apenas em ocasião de crise aguda.

- 10) Na suspeita de um EIM, medidas terapêuticas específicas devem ser aplicadas com agilidade e rapidez, já que alguns EIM, por exemplo algumas acidúrias orgânicas, podem ter uma evolução bastante favorável após a resolução do quadro agudo.
- 11) No caso de uma suspeita clínica específica para determinada(s) patologia(s), mesmo na vigência de testes de triagem negativos, a investigação dirigida deve avançar com exames mais sofisticados.
- 12) Nos casos que evoluem desfavoravelmente, é importante a coleta e o armazenamento de amostras adequadas antes do óbito, para tentar estabelecer o diagnóstico e beneficiar a família.
- 13) O diagnóstico definitivo de um EIM é importante porque pode permitir um tratamento específico, evita a realização de exames desnecessários, permite o aconselhamento genético dos casais em risco e o oferecimento de diagnóstico pré-natal em uma próxima gestação.
- 14) O protocolo de investigação de EIM em crianças gravemente enfermas proposto neste trabalho mostrou-se eficaz, já que permitiu o diagnóstico de um EIM em mais de 10% da amostra estudada.

Agradecimentos

Aos colegas pediatras que colaboraram para este trabalho, encaminhando casos para avaliação metabólica. Aos colegas do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que se envolveram na discussão clínica e na aplicação das técnicas de diagnóstico.

Referências bibliográficas:

1. Beaudet AL, Scriver CH, Sly WS, Valle D. Genetics, biochemistry and molecular basis of variant human phenotypes. In: Scriver CH, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*. 7^a ed. New York: McGrawHill; 1995. p.53-228.
2. Cohn RM, Roth KS. Catastrophic diseases presenting in the newborn period. In: *Metabolic disease: a guide to early recognition*. Philadelphia: WB Saunders; 1983. p.3-6.
3. Burton BK. Inborn errors of metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics* 1987; 79: 359-69.
4. Burton BK. Inborn errors of metabolism in infancy: a guide to diagnosis. *Pediatrics* 1998; 102: e69.
5. Jardim LB, Ashton-Prolla. Erros inatos do metabolismo em crianças e recém-nascidos agudamente enfermos: guia para seu diagnóstico e manejo. *J pediatr (Rio J.)* 1996; 72:63-70.
6. Wanmacher CMD, Wajner M, Giugliani R, Giugliani ERJ, Costa MG, Giugliani MCK. Detection of metabolic disorder among high risk patients. *Rev Brasil Genet* 1982; 5: 187-94.
7. Arens R, Gozai D, Williams JC, Ward SLD, Keens TG. Recurrent apparent life-threatening events during infancy: A manifestation of inborn errors of metabolism. *J Pediatr* 1993; 123: 415-8.
8. Duran M, Dorland L, Wadman SK, Berger R. Group tests for selective screening of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr* 1994; 153 (suppl 1): S27-S32.
9. Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10.000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 650-4.
10. Giugliani R. Erros inatos do metabolismo – uma visão panorâmica. *Pediatria Moderna* 1988; 22: 29-40.
11. Green A. Guide to diagnosis of inborn errors of metabolism in district general hospital. *J Clin Pathol* 1989; 42:84-91.
12. Burton BK. Clinical diagnosis of the inborn errors of metabolism in the neonatal period. *Pediatrics* 1978; 61: 398-405.
13. Chalmers RA, Lawson AM. Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborn and children. *J Inher Metab Dis* 1980; 3: 27-43.
14. Haan EA, Danks DM. Clinical investigation of suspected metabolic diseases. In: Barson AJ, ed. *Laboratory investigation of fetal disease*. Bristol: John Wright; 1981. p. 410-28.
15. Holton JB. Diagnosis of inherited metabolic diseases in severely ill children. *Ann Clin Biochem* 1982; 19:389-95.
16. Galjaard H. Biochemical Approaches to early diagnosis and prevention of genetic diseases. In: Arima M, Suzuki Y, Yabuuchi H, eds. *The developing brain and its disorders*. Tóquio: Ed. Karger; 1985. p 113-7.
17. Leonard JV. The early detection and management of inborn errors of metabolism presenting acutely in the neonatal period. *Eur J Pediatr* 1985; 143:253-7.
18. Goodman SI. Inherited metabolic disease in the newborn: an approach to diagnosis and treatment. *Adv Pediatr* 1986; 33:197-24.
19. Bickel H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme* 1987; 38:14-26.
20. Green A. Investigation of inborn errors of metabolism – an approach to diagnosis. *J Internat Fed Clin Chem* 1991; 3: 104-5.
21. Wajner M, Sanseverino MT, Giugliani R, Sweetmann L, Yamagushi S, Fukao T et al. Biochemical investigation of a Brazilian patient with a defect of mitochondrial acetoacetylcoenzyme-A thiolase. *Clin Genet* 1992; 41:202-5.
22. Barth ML, Giugliani R, Goldenfun SL, Munarski R, Folberg A, Lekhwani C, et al. Application of a flow-chart for the detection of lysosomal storage diseases in 105 high-risk Brazilian patients. *Am J Med Genet* 1990; 37: 534-7.
23. Ozand PT, Gascon GG. Organic acidurias: a review. Part 1. *J Chil Neurol* 1991; 6: 196-219.
24. Lehnert W. Long-term results of selective screening for inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr* 1994, 153: S9-S13.
25. Wajner M, Vargas CR, Coelho DM, Barschak AG, Furlanetto V, Araújo PR et al. Diagnosis of organic acidurias in high-risk Brazilian patients. Resumos do II Congresso Latinoamericano de Erros Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal; Chile, 1999.
26. Green A. When and how should we measure plasma ammonia? *Ann Clin Biochem* 1988; 25: 199-209.
27. Burlina AB, Bonafé L, Zachello F. Clinical and biochemical approach to the neonate with a suspected inborn error of amino acid and organic acid metabolism. *Sem Perinatol* 1999; 23: 162-73.

28. Giugliani R. Guidelines for emergency specimen collection from critically ill patients suspected of having metabolic diseases. *Rev Brasil Genet (Brazil J Genetics)* 1990; 13: 383-6.
29. Hoffman GF. Selective screening for inborn errors of metabolism - past, present and future. *Eur J Pediatr* 1994; 153: S2-S8.

Endereço para correspondência:

Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino
Serv. de Genética Médica – Hosp. Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-00
Porto Alegre - RS – E-mail: msanseverino@hcpa.ufrgs.br