



ARTIGO ORIGINAL

Tirosinemia neonatal transitória: uma alteração frequente*Transient neonatal tyrosinemia: a frequent abnormality*

Eurico Camargo Neto¹, Jaqueline Schulte², Elaine V. Anele², Rosélia Rubim², Eduardo Lewis³,
Jurema De Mari⁴, Adriana Brites⁵, Ricardo F. Pires⁶, Roberto Giugliani⁷

Resumo

Objetivos: Avaliar a frequência da tirosinemia neonatal transitória, com ou sem hiperfenilalaninemia secundária, observada através da triagem neonatal para erros inatos do metabolismo (“teste do pezinho”), e a necessidade de monitoramento e eventual intervenção medicamentosa e/ou dietética em casos específicos.

Métodos: Foram analisadas 457.870 amostras de sangue seco obtido por punção de calcâneo de crianças de 3 a 20 dias de vida, através de cromatografia qualitativa de aminoácidos em camada delgada. Os casos positivos foram confirmados quantitativamente em amostras séricas pelas dosagens fluorimétricas da tirosina e da fenilalanina.

Resultados: 1.231 amostras de sangue seco impregnado em papel filtro apresentaram resultados positivos para tirosina na avaliação cromatográfica. A análise sérica por método fluorimétrico revelou valores normais de tirosina e fenilalanina em 822 pacientes; os restantes 409 apresentaram tirosina elevada e foram divididos em três grupos de acordo com a concentração de tirosina observada. Em 118 destes pacientes foram observados também níveis de fenilalanina superiores ao limite de referência.

Conclusões: A tirosinemia neonatal transitória é um distúrbio muito frequente em recém-nascidos (1/372), sendo que em alguns casos também são registrados elevados níveis de fenilalanina. Enquanto não estiver demonstrado que esse achado é completamente inócuo, o monitoramento desses pacientes e o eventual emprego de medidas que reduzam os níveis de tirosina e fenilalanina devem ser considerados pelo pediatra.

J. pediatr. (Rio J.). 1998; 74(6):447-450: tirosinemia, erros inatos do metabolismo, aminoacidopatias, triagem neonatal.

Abstract

Objective: To evaluate the frequency of transient neonatal tyrosinemia, with or without secondary hyperphenylalaninemia, observed through neonatal screening for metabolic disorders, and the need of monitoring and intervention with drugs and/or special diet in selected cases.

Methods: 457.870 dried blood samples obtained by heel stick from 3 to 20 days old babies were qualitatively evaluated by amino acid thin-layer chromatography. Positive cases were quantitatively confirmed in serum samples by fluorimetric measurement of tyrosine and phenylalanine.

Results: 1.231 dried blood samples displayed positive results for tyrosine in the chromatographic evaluation. The fluorimetric serum analysis disclosed normal levels of tyrosine and phenylalanine in 822 patients. The remained 409 patients showed high tyrosine levels and were placed in three groups according to the tyrosine concentration. In 118 of these cases serum phenylalanine was also increased.

Conclusions: Transient neonatal tyrosinemia is a very frequent disorder in neonates (1/372); in some cases very high levels were found, not only of tyrosine but also phenylalanine. As this finding is not yet accepted as absolutely harmless, the monitoring of this situation and the use of measures to lower the tyrosine and phenylalanine levels should be considered by the pediatrician.

J. pediatr. (Rio J.). 1998; 74(6):447-450: tyrosinemia, inborn error of metabolism, amino acid disorders, neonatal screening.

1. Mestre em Bioquímica, Bioquímico responsável técnico pelo Centro de Triagem Neonatal, Laboratório Nobel RIE e DNA4 - Laboratório de Genética e Biologia Molecular.
2. Bioquímica do Laboratório Nobel RIE.
3. Mestre em Bioquímica, Biólogo do DNA4 - Laboratório de Genética e Biologia Molecular.
4. Bioquímica do DNA4 - Laboratório de Genética e Biologia Molecular.
5. Bióloga do Centro de Triagem Neonatal.
6. Médico do Serviço de Genética Médica do HCPA.
7. Doutor em Genética, Professor do Departamento de Genética da UFRGS e Chefe do Serviço de Genética Médica do HCPA.

Introdução

A tirosina é um aminoácido não-essencial, proveniente da dieta, da hidroxilação da fenilalanina ou do catabolismo protéico¹ e pode ter duas diferentes rotas metabólicas: a sua conversão a aminas biológicas através de várias etapas catalisadas por enzimas específicas^{2,3} ou a sua oxidação no ciclo dos ácidos tricarbóxicos a CO₂ e H₂O^{2,3,4}. A tirosinemia neonatal transitória (TNT) é devi-

da à imaturidade da enzima p-hidroxifenilpiruvato oxidase hepática, ao elevado consumo de fenilalanina e tirosina e à relativa deficiência de ascorbato^{5,6}. Em neonatos com TNT nascidos a termo, os níveis séricos costumam ser baixos nos primeiros dois dias pós-parto e alcançam picos máximos na segunda semana de vida, podendo ocorrer em até 30% dos prematuros⁷. A TNT se diferencia dos erros inatos do metabolismo associados ao aumento sérico da tirosina por não estar vinculada à herança genética e por apresentar atividade normal das enzimas deficientes nas tirosinemias tipo I (fumarilacetoacetato hidrolase), tipo II (tirosina aminotransferase), tipo III e hawkinsinúria (4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase) e alcaptonúria (ácido homogentísico oxidase)¹. A tirosinemia tipo I ou hepatorenal, de quadro clínico mais severo, pode manifestar-se já no período neonatal por falência hepática aguda, cirrose, carcinoma hepatocelular, síndrome de Fanconi, glomeruloesclerose e crises neuropáticas periféricas⁵; e seu diagnóstico definitivo é realizado através de ensaios enzimáticos específicos⁸ ou pela detecção de mutações no gene que codifica a enzima fumarilacetoacetato hidrolase^{9,10}. A tirosinemia tipo II está associada a retardo mental, hiperqueratose palmar e úlceras na córnea; a tipo III, a moderado retardo mental, mas sem comprometimentos oftalmológicos ou manifestações dermatológicas⁵. Embora a maioria das crianças com TNT seja assintomática, efeitos adversos no desenvolvimento não devem ser completamente desconsiderados⁵. Estudos prévios desenvolvidos por Mamunes e colaboradores¹¹ em 15 neonatos a termo com TNT com valores entre 13,6 a 42,0mg/dL (normal até 4,0mg/dL), durante, em média, 50 dias, revelaram escores significativamente menores no desenvolvimento intelectual dessas crianças devido à alta ingesta protéica e à falta de suplementação de vitamina C. O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de TNT em recém-nascidos em nosso meio, averiguar sua associação com o aumento secundário da fenilalanina e estimar o tempo decorrente até a normalização dos níveis séricos de ambos os aminoácidos.

Métodos

Foram analisadas 457.870 amostras de sangue seco em papel filtro SS 903, recebidas de todas as regiões do país (40,8% do RS), obtidas por punção de calcâneo de crianças entre 3 e 20 dias de vida, submetidas ao rastreamento neonatal para doenças metabólicas e infecciosas junto ao Centro de Triagem Neonatal, Porto Alegre, RS. A tirosina foi inicialmente avaliada através de uma cromatografia de aminoácidos em camada delgada¹², e um caso considerado positivo quando se apresentava visualmente mais concentrado que o controle de referência (4,0mg/dL). Os casos positivos foram confirmados através da dosagem da tirosina e da fenilalanina em amostras séricas obtidas 5 a 20 dias após a punção de calcâneo (média = 7; mediana = 10) por método fluorimétrico^{13,14}. Foram excluídos do trabalho pacientes com coleta de calcâneo obtida com mais de 20 dias de vida, amostras séricas obtidas após 20

dias da primeira coleta de sangue seco em papel filtro e 131 pacientes que não compareceram para confirmação do primeiro teste alterado. Para efeito de acompanhamento, os pacientes foram classificados em três grupos de acordo com os valores séricos de tirosina, expressos em mg/dL. Grupo A: entre 4,1 e 10,0; grupo B: entre 10,1 e 25,0; e grupo C: acima de 25,0. Em comum acordo com o pediatra, o geneticista ou, na ausência desses em algumas regiões, com o responsável pela criança, os pacientes do grupo A foram orientados para a colheita de nova amostra sérica após 10 dias a contar da obtenção da amostra anterior, sem restrição protéica, mas com a ingesta de 100mg/dia de vitamina C. Em pacientes dos grupos B e C, recomendou-se a diluição do leite durante 2 semanas com água fervida ou "água de arroz" (no sentido de diminuir temporariamente o aporte protéico), seguido de uma semana de dieta livre, e repetiram-se as determinações de fenilalanina e tirosina séricas, devido à dificuldade em estabelecer rigidamente uma dieta protéica contendo, no máximo, 3 a 4g/proteína/kg/dia e levando-se em consideração que várias crianças recebiam suplementação alimentar dependente de escasso aleitamento materno e de diferentes níveis sócio-econômicos das famílias envolvidas.

Resultados

Em 457.870 amostras, foram identificados 1.231 pacientes com tirosina elevada que atenderam à solicitação de submeterem-se à nova coleta. Destes, 822 já apresentavam níveis séricos normais de tirosina (até 4,0mg/dL) na segunda amostra, e em 409 observaram-se valores elevados: 414 foram classificados no grupo A; 53 no grupo B; e 42 no grupo C (ver distribuição na Figura 1). Das 409 crianças com tirosinemia, 118 apresentaram hiperfenilalaninemia secundária, com níveis séricos de fenilalanina entre 4,1 e 16,7mg/dL (normal: até 4,0 mg/dL) e que normalizaram com a correção dos níveis de tirosina. Esse

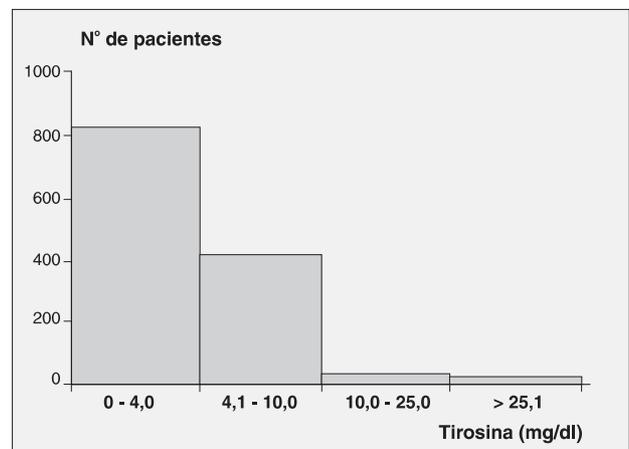


Figura 1 - Distribuição dos níveis séricos de tirosina em 1.231 pacientes com teste de triagem inicial positivo

dado corresponde a 9,6% de hiperfenilalaninemias secundárias do total de 1.231 casos de TNT e a 28,9% dos 409 casos de hipertirosinemias prolongadas (tirosina ainda elevada na segunda ou demais amostras de soro). Devido ao preenchimento incompleto de dados de cada paciente submetido à triagem neonatal, em apenas 153 das 409 amostras alteradas foi referida a idade gestacional, das quais 33 crianças (21,5%) nascidas com menos de 37 semanas de gestação. Nos pacientes prematuros não foi sugerida a retirada do leite materno; a hipertirosinemia variou entre 4,1 e 12,7 (média de 6,0mg/dL) em 31 casos (94%); e dois pacientes com idades gestacionais de 36 e 34 semanas apresentaram tirosina sérica de 25,5mg/dL e 32,2mg/dL, respectivamente. Todos fizeram uso exclusivo de vitamina C e normalizaram em um período de 30 a 83 dias. Estudo de regressão linear entre os valores de fenilalanina e tirosina mostrou um coeficiente de correlação de 0,007. Todos os pacientes normalizaram seus níveis séricos de tirosina e fenilalanina em um período máximo de 180 dias, sem correlação com os valores obtidos na primeira amostra de soro.

Discussão

Devido à importância da detecção precoce da tirosinemia hereditária, a triagem neonatal específica para essa doença é rotina em dois Estados americanos (Georgia e Maryland)¹⁵ e no Canadá (Quebec)¹⁶. Níveis elevados de tirosina podem produzir resultados falso positivos para fenilcetonúria, quando essa doença é pesquisada através de testes bacteriológicos (teste de Guthrie) ou de alguns métodos fluorimétricos automatizados¹⁷ que não contam com a especificidade dos novos testes enzimáticos¹⁸, da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) ou da espectroscopia de massa¹⁹. O teste falso positivo pode ser causa de profundo *stress* familiar devido à perspectiva de estar diante de uma doença genética de difícil tratamento, prognóstico reservado e evolução variável dependendo da idade em que a doença é identificada. A utilidade da cromatografia de aminoácidos em programas de triagem neonatal²⁰ e os achados relativos às diferentes aminoacidopatias permanentes ou transitórias por ela detectadas em nosso meio já foram previamente publicados^{21,22}. Embora a análise não seja quantitativa, sua eficácia na discriminação dos diversos aminoácidos também já foi por nós demonstrada¹². Ainda que o aumento transitório da tirosina seja considerado geralmente benigno, isso ainda não está completamente definido, e dados da literatura demonstram que nem todas as crianças hipertirosinêmicas têm desenvolvimento intelectual normal^{11,23}. Os resultados apresentados neste estudo mostram que 1 em cada 372 crianças cuja amostra de sangue seco em papel filtro foi obtida entre 3 e 20 dias de vida apresenta TNT; em 68 pacientes detectaram-se níveis de tirosina dentro do intervalo de risco descrito por Mamunes (13,6 a 42,0mg/dL)¹¹ e em 10 pacientes, níveis de tirosina ainda mais elevados (entre 42,0 e 52,6mg/dL). É importante ressaltar que um total de 118 amostras de pacientes hipertirosinê-

micos também apresentaram níveis séricos de fenilalanina superiores ao limite de referência (4,0 mg/dL), devido a um efeito de retroinibição que diminui a velocidade da conversão da fenilalanina em tirosina, os quais não podemos comprovar se estavam em ascensão ou queda no momento da obtenção do soro, mas cujos efeitos nocivos poderiam teoricamente levar a graus variados de retardo mental²⁴. Dependendo da especificidade do método de avaliação utilizado, neonatos com níveis de fenilalanina dentro do limite de normalidade (até 4,0mg/dL) podem ter um falso diagnóstico de fenilcetonúria no “teste do pezinho”, devido à interferência produzida pelos altos níveis de tirosina. O coeficiente de correlação linear ($r=0,007$) calculado pelos valores de fenilalanina e tirosina sugere que a elevação dos níveis de fenilalanina não está necessariamente associada aos valores de tirosina nesses pacientes. Todos os pacientes estudados neste trabalho tiveram seus níveis séricos normalizados após algum tempo, o que pode estar relacionado com a administração de vitamina C e/ou restrição protéica, de acordo com dados previamente relatadas na literatura^{25,26}. O mecanismo de ação da vitamina C está relacionado à inativação da p-hidroxifenilpiruvato oxidase hepática pelo seu próprio substrato, condição esta que pode ser prevenida de forma inespecífica pelo aumento da concentração do ascorbato sérico²⁷. Os dados do presente trabalho sugerem que a substituição precoce do leite materno por leite integral, desnatado ou leite industrializado pode estar relacionada ao aumento generalizado e transitório de vários aminoácidos, particularmente tirosina, fenilalanina, metionina, alanina, valina, serina, isoleucina, leucina, arginina, serina, histidina e hidroxiprolina, encontrados em 42 pacientes e cuja interpretação não faz parte do objetivo deste estudo. Também nesses pacientes as concentrações séricas desses aminoácidos normalizaram progressivamente, com provável influência do menor aporte protéico e da suplementação com vitamina C, em períodos que variaram de 20 dias a 6 meses de vida. Como indicado na literatura⁵, prematuridade, deficiência de vitamina C, ingesta protéica superior a 5g/kg/dia e alimentação com leite animal parecem estar relacionadas à TNT. A estimativa da incidência de TNT é dependente dos valores de referência estabelecidos pelo laboratório, do momento da obtenção da amostra (tempo da última alimentação e idade da criança) e da origem do leite ingerido. De acordo com Mitchell e colaboradores⁵, não dispomos de estudos sobre tirosinemia associada a dieta, desenvolvimento intelectual e etnia; mas pode-se afirmar que sua incidência diminuiu gradualmente na Europa, Estados Unidos e Canadá após a mudança da alimentação baseada em leite animal para fórmulas com menores concentrações protéicas e estímulo ao aleitamento materno.

Conclusões

O aumento de tirosina é a alteração mais frequente observada no nosso programa de triagem neonatal. A confirmação de uma TNT em cada 372 amostras testadas

e a presença de hiperfenilalaninemia em 28,9% das mesmas evidenciam a necessidade de monitoramento laboratorial desses pacientes, no sentido de prevenir os possíveis efeitos de desenvolvimento intelectual e/ou motor provocados por altos níveis de tirosina, eventualmente associados a aumento secundário da fenilalanina, e de acompanhamento dos casos até seu completo esclarecimento diagnóstico.

Referências bibliográficas:

- Berger R. Tyrosinemia. In: Blau N, Duran, Blaskovics, eds. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. 1996. p. 107-16.
- Rodwell VW. Conversión de aminoácidos a productos especializados. In Murray RK, Granner BK, Mayes PA, Rodwell VW, eds. *Bioquímica de Harper*. 24ª ed. México D.F. - Santa Fé de Bogotá Editorial El Manual Moderno, 1997. p. 389-400.
- Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P, White A. *Principles of Biochemistry: General Aspects*. 7ª ed. New York: McGraw Hill Book Company; 1983. p. 622-649.
- Orten JM, Neuhaus TW. *Human Biochemistry*. 10ª ed. St Louis: C.V.Mosby; 1982. p. 327-374.
- Mitchell GA, Lambert M, Tanguay. Hypertyrosinemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7ª ed. New York: McGraw Hill Book Company; 1997. CD-ROM, cap. 28.
- Goldsmith LA. In: Stanbury JB, Wyngaarde JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 5ª ed. New York: McGraw Hill Book Company; 1983. p. 287-299.
- Bremer HJ, Duran M, Kamerling JP, Przyrembel H, Wadman SK. *Disturbances of amino acid metabolism: clinical chemistry and diagnosis*. 1ª ed. Munich-Baltimore: Urban&Schwarzenberg; 1981. p. 382-85.
- Laberge C, Grenier A, Valet JP, Morissette J. Fumarylacetoacetase measurement as a mass-screening procedure for hereditary tyrosinemia type I. *Am J Hum Genet* 1990; 47:325-28.
- Bergman AJ, van der Berg IE, Brink W, Poll-The BT, Ploos van Amstel JK, Berger R. Spectrum of mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene of tyrosinemia type I patients in northwestern Europe and Mediterranean countries. *Hum Mutat* 1998;12:19-26
- Rootwelt H, Berger R, Gray G, Kelly DA, Coskun T, Kvittingen EA. Novel splice, missense, and nonsense mutations in fumarylacetoacetase gene causing tyrosinemia type I. *Am J Hum Genet* 1994; 55:653-58.
- Mamunes P, Prince PE, Thornton NH, Hunt PA, Hitchcock ES. Intellectual deficits after transient tyrosinemia in the term neonate. *Pediatrics* 1976;57:675-80.
- Camargo Neto E, Schulte J, Silva LCS, Giugliani R. Cromatografia em camada delgada para a detecção neonatal da fenilcetonúria e outras aminoacidopatias. *Rev Bras Anal Clin* 1993; 25:81-82.
- Phillips, RE. Tyrosine in serum. In: Turner, GK. ed. *Manual of fluorimetric clinical procedures*. Palo Alto: GK Turner Associates, 1967.
- McCaman M, Robins E. Fluorimetric method for the determination of phenylalanine in serum. *J Lab Clin Med* 1962; 59:885-890.
- Therrel BL. U.S. National Screening Status Report. *Infant Screening* 1997;20:7.
- Grenier A, Laberge C. Neonatal screening for tyrosinemia type and early sampling. In: Levy HL, Hermos RJ, Grady GF, eds. *Proceedings of the Third Meeting of the International Society for Neonatal Screening*. Boston, MA, USA, p. 141-42.
- Naruse H, Ohashi YY, Tsuji A, Maeda M, Nakamura K, Fujii T, et al. A method of PKU screening using phenylalanine dehydrogenase and microplate system. *Screen* 1992; 1:63-66.
- Elvers LH, Diependaal GAM, Blomk HJ, Loeber JG. Phenylketonuria screening using the Quantase phenylalanine kit in combination with a microfilter system and the dye Tartrazine. *Screen* 1995;3:209-23.
- Chace DH, Millington DS, Hillman SL. The role of tandem mass spectrometry in reducing the number of false positive and false negative results in the diagnosis of metabolic disease from dried blood spots. In: Pass KA, Levy, HL, eds. *Early hospital discharge: impact on newborn screening. The council of regional networks for genetics services*, Atlanta, GE: Emory University School of Medicine. 1995. p.272-83.
- Clift H, Hall SK, Denmead R, Green A Carte RA, Green. *Screening* 1994;3:39-432.
- Camargo Neto E, Jardim L, Leite JL, Silveira EL, Barth ML, Giugliani R. Neonatal screening for amino acid disorders in Southern Brazil: results of a pilot study. Abstract of the 43rd National Meeting of the American Association for Clinical Chemistry, Washington, DC, USA. *Clin Chem* 1991;37:989.
- Camargo Neto E, Schulte J, Lewis E, Giugliani R. Two-years report from a multi-regional brazilian screening program (projeto Novo Tempo/Inamex). In: Wilcken B, Webster D, eds. *Neonatal screening in the nineties*. New South Wales: The Kelvin Press; 1991. p.45-46.
- Menkes JH, Welcher DW, Levy HS, Dallas BA, Gretskey NE. Relationship of elevated blood tyrosine to the ultimate intellectual performance of premature infants. *Pediatrics* 1972; 49:218-224.
- Guthrie R. The origin of newborn screening. *Screen* 1992; 1:5-15.
- Avery ME, Clow CL, Menkes JH, Ramos A, Scriver CR, Stern L, Wasserman BP. Transient tyrosinemia of the newborn: dietary and clinical aspects. *Pediatrics* 1967; 39: 378-84.
- Fernbach SA, Summons RE, Pereira WE, Duffiel AM. Metabolic studies of transient tyrosinemia in premature infants. *Pediatr Res* 1975;9:172-76.
- Nutrition Committee, Canadian Paediatric Society. Vitamin C for prophylaxis of tyrosinemia in the newborn. *Can Med Assoc J* 1976;114:447.

Endereço para correspondência:

Eurico Camargo Neto

Centro de Triagem Neonatal

Rua Chaves Barcelos, 36/1706 - Porto Alegre - RS - Brasil

Telefone/Fax: (051) 225.6200

E-mail: eneto@voyager.com.br