

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**DIAGNÓSTICOS DE ACIDEMIAS ORGÂNICAS E DEFEITOS DE BETA
OXIDAÇÃO MITOCONDRIAL DE ÁCIDOS GRAXOS NO SERVIÇO DE
GENÉTICA MÉDICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

Janine Machado da Silva

Orientação: Prof. Dra Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, novembro de 2016.

Este trabalho foi elaborado de acordo com as normas para publicação da revista Clinical and Biomedical Research que constam em anexo.

Resumo

Introdução: Os EIM são doenças causadas por uma falha no metabolismo decorrentes de deficiência ou ausência de uma enzima originadas por um defeito genético, que podem provocar o acúmulo de substratos. O objetivo deste estudo foi conhecer a frequência de diagnóstico de acidemias orgânicas e defeitos de beta oxidação mitocondrial dos pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, cujo diagnóstico é fundamental no sentido de iniciar o tratamento permitindo melhor prognóstico.

Materiais e Métodos: Foram avaliados 8537 pacientes submetidos à análise de ácidos orgânicos na urina por GC-MS e 7268 pacientes cujas amostras de sangue impregnado em papel filtro foram submetidas a análise de acilcarnitinas por LC/MS/MS durante o período de julho de 2008 a julho de 2016.

Resultados: Um total de 245 pacientes foram diagnosticados com doenças metabólicas herdadas, incluindo diagnósticos de acidemia láctica (21%), acidemia glutárica (19%), acidemia metilmalônica (12%) e acidemia 3-OH-3-metilglutárica (10%), além de defeitos de beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos como MADD, VLCADD, LCHADD, MCADD e SCADD. Os sintomas mais frequentemente encontrados foram relacionados ao SNC, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e acidose metabólica. A idade média no momento do diagnóstico foi 4,68 anos (56 meses).

Conclusão: Foi observado aumento da frequência de diagnósticos de acidemias orgânicas e defeitos de beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos nos últimos anos, em comparação a estudos anteriores, em especial acidemia glutárica tipo I e 3-OH-3-metilglutárica, muito prevalentes no Brasil e em Portugal. Cabe salientar a importância da utilização da metodologia espectrometria de massas na investigação destes EIM.

Palavras chave: erros inatos do metabolismo, acidemias orgânicas, defeitos de beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem

Abstract

Introduction: IEM are diseases caused by a metabolism failure due deficiency or absence of an enzyme caused by a genetic defect which can cause the accumulation of substrates. The aim of this study was know the diagnosis frequency of organic acidemias and mitochondrial fatty acid beta oxidation defects in patients at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, whose diagnosis is essential in order to start the treatment allowing a better prognosis.

Materials and Methods: A total of 8537 patients submitted to organic acids analysis in the urine by GC-MS and 7268 patients with blood samples impregnated on filter paper submitted to acylcarnitine analysis by LC/MS /MS during the period of July 2008 to July 2016 were analysed

Results: A total of 245 patients were diagnosed with inherited metabolic diseases, including diagnoses of lactic acidemia (21%), glutaric acidemia (19%), methylmalonic acidemia (12%) and 3-OH-3-methylglutaric acidemia (10%), as well as mitochondrial fatty acid beta oxidation defects such as MADD, VLCADD, LCHADD, MCADD and SCADD. The most frequently noticed symptoms were related to CNS, neuropsychomotor developmental delay and metabolic acidosis. The mean age at diagnosis was 4.68 years (56 months).

Conclusions: We noticed an increase in the frequency of diagnoses of organic acidemias and defects of mitochondrial fatty acid beta oxidation defects in recent years, in comparison to previous studies, especially glutaric acidemia type I and 3-OH-3-methylglutaric acidemia, most prevalent in Brazil and in Portugal. It is important to point out the importance of using the mass spectrometry methodology in the investigation of these IEM.

Keywords: inborn errors of metabolism, organic acidemias, mitochondrial fatty acid beta oxidation defects, gas chromatography coupled to mass spectrometry, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Introdução

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças causadas por uma falha no metabolismo decorrentes de deficiência ou ausência de uma enzima ou proteína de transporte originadas por um defeito genético¹. A maioria destas deficiências é herdada de modo autossômico recessivo apesar de algumas estarem ligadas ao cromossomo X². Desse modo, a probabilidade de ocorrência da doença aumenta se os pais possuem algum histórico de consanguinidade, doenças hereditárias e relato de morte no período neonatal na família.

A deficiência enzimática provoca o acúmulo do substrato nos tecidos, a menos que seja utilizado por uma via metabólica alternativa. O acúmulo de certas substâncias pode levar a crises metabólicas graves que podem levar o paciente a desenvolver danos neurológicos permanentes ou até mesmo à morte³.

Os EIM podem ser classificados em três grupos de acordo com os sistemas afetados e o tipo de sintoma que podem causar⁴.

Grupo 1: reúne os EIM intermediário que provocam toxicidade quando presentes em concentrações acima dos valores normais e são decorrentes da falha na via metabólica. Neste grupo encontram-se aminoacidopatias, a maioria das acidemias orgânicas, doenças do ciclo da ureia, intolerância aos carboidratos e porfirias. Caracterizam-se por sintomas agudos desencadeados por desequilíbrio na dieta, infecções e febre.

Grupo 2: definido pela deficiência na produção ou utilização de energia, como as acidemias lácticas, os defeitos na beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos, na produção de corpos cetônicos e alterações no metabolismo do glicogênio que dão origem a sintomas de déficit energético como hipoglicemia.

Grupo 3: caracterizado por defeitos no metabolismo de moléculas complexas como as doenças lisossômicas de depósito e doenças peroxissomais. Nesse grupo de doenças ocorre acúmulo progressivo nas organelas responsáveis pelas vias de degradação dessa classe de compostos. São doenças marcadas por anormalidades físicas, predominantemente esqueléticas.

Apesar de serem consideradas doenças raras, os EIM somam mais de 500 tipos diferentes e mesmo com uma frequência individual reduzida, se tornam frequentes em seu conjunto, com uma incidência cumulativa estimada em 1:1.000 recém-nascidos vivos⁵.

Acidemias orgânicas

As acidemias orgânicas são EIM que afetam o metabolismo intermediário de aminoácidos, carboidratos e lipídeos. Devido à deficiência de enzimas/transportadores responsáveis pelo metabolismo de ácidos orgânicos, estes se acumulam no organismo, conseqüentemente ocorrem alterações em sistemas variados, incluindo o sistema nervoso central^{2,6}. Mais de 65 tipos diferentes de acidemias orgânicas são conhecidas. A incidência é de 1:21.000 nascidos vivos, mas pode variar conforme o grupo populacional estudado⁷. Em função de seu caráter ácido, o acúmulo dos ácidos orgânicos nos fluidos corporais causa acidose metabólica, característica marcante dessa classe de EIM. Além disso, os pacientes também apresentam anion gap elevado, hiperamonemia, hipoglicemia, cetose e sintomas neurológicos que podem variar de letargia ao coma, constituindo um quadro grave de desequilíbrio metabólico que pode causar danos irreversíveis ao paciente¹.

Como parte do tratamento, os pacientes devem seguir uma dieta extremamente restrita em proteínas, algumas vezes suplementada com carnitina ou vitaminas, a fim de evitar o aumento dos ácidos orgânicos no organismo e, conseqüentemente, crises metabólicas que podem se estabelecer. Apesar do controle dietético, infecções e situações de estresse também podem desencadear crises, tornando a doença de difícil controle. Esses quadros de desequilíbrio metabólico caracterizam-se como emergências médicas e requerem suporte especializado imediato em hospitais de grande porte por representarem risco à vida¹. O diagnóstico das acidemias orgânicas é feito através da identificação dos ácidos orgânicos acumulados nos fluidos corporais, sendo a urina o material biológico de escolha para o diagnóstico devido à excreção aumentada no caso de doença. A análise é realizada por meio de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS) que permite a observação de compostos característicos ou padrões de eliminação de ácidos orgânicos anormais que são determinantes para o diagnóstico dessas doenças⁸.

Defeitos de Beta Oxidação

Nos defeitos de beta-oxidação de ácidos graxos as células são impossibilitadas de utilizar os ácidos graxos provenientes da dieta e do tecido adiposo como fonte de energia. Apesar da glicose ser a principal fonte energética para o organismo, os ácidos graxos são usados como fonte preferencial de energia por alguns órgãos como o coração, músculo esquelético e rins mesmo no estado alimentado, além de prover energia através de sua oxidação em estados de jejum e durante exercício físico quando a maior parte da glicose já foi utilizada durante a glicólise. Nestes EIM, os defeitos podem ocorrer em qualquer parte do metabolismo dos ácidos graxos como: defeitos de transporte através da membrana plasmática ou da membrana mitocondrial, além de ocorrerem também nas vias de beta oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, média ou curta⁹. Devido a não utilização dos ácidos graxos livre como fonte de energia, ocorre acúmulo destes e de intermediários de acil-CoA no organismo, encontrando-se acima dos valores considerados normais, levando à formação de ácidos dicarboxílicos e hidroxicarboxílicos e conversão de ésteres de acil-CoA em suas correspondentes acilcarnitinas e acilglicinas¹.

Os sintomas provocados pelos defeitos de beta oxidação são decorrentes da falha no metabolismo em se manter energeticamente. Os sinais e sintomas mais comuns, portanto, são hipoglicemia hipocetótica que pode levar ao coma e convulsões, e fraqueza muscular, manifestando-se geralmente no período neonatal. Podem ocorrer também sintomas cardíacos e hepáticos. O sistema nervoso central é frequentemente afetado devido à gravidade da hipoglicemia desenvolvida que pode surgir sob condições de jejum, estresse e exercício físico⁹. O diagnóstico dos defeitos de beta oxidação deve ser feito através da avaliação do perfil de acilcarnitinas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC/MS/MS) utilizando como amostra sangue impregnado em papel filtro¹⁰, e no momento da crise metabólica, um perfil alterado de ácidos dicarboxílicos pode ser detectado na urina por GC-MS. Além da análise de metabólitos em fluidos como sangue e urina, também pode ser realizado o diagnóstico molecular tanto das acidemias orgânicas como dos defeitos de beta-oxidação a fim de identificar a mutação envolvida na doença.

O objetivo do trabalho foi conhecer a frequência de diagnóstico de acidemias orgânicas e defeitos de beta oxidação mitocondrial dos pacientes avaliados no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de julho de 2008 a julho de 2016.

Materiais e Métodos

As análises de ácidos orgânicos na urina foram realizadas em 8537 pacientes e 7268 amostras de sangue impregnado em papel filtro foram utilizadas para análise do perfil de acilcarnitinas de pacientes com suspeita de EIM com idades entre 0 e 45 anos, provenientes de várias regiões do Brasil durante o período de julho de 2008 a julho de 2016, cujo diagnóstico foi realizado no Laboratório de Análise de Metabólitos (LAM) do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras utilizadas foram urina ocasional (2-10 mL), que foram mantidas congeladas até o momento da análise, e sangue venoso heparinizado, o qual foi impregnado em papel filtro. Também se obteve plasma dos pacientes, que foi mantido congelado até o momento da análise. Para auxiliar na investigação diagnóstica foram obtidas informações dos pacientes como idade, sexo, consanguinidade entre os pais, história familiar de EIM e casos de morte súbita neonatal na família.

Quando não havia suspeita clínica sugestiva de algum EIM específico, as amostras de urina passaram por testes de triagem qualitativos: teste do cloreto férrico para fenilcetonas, teste da 2-4-dinitrofenilhidrazina para alfa-cetoácidos, teste do nitrosonaftol para tirosina e seus derivados, teste do cianeto-nitroprussiato para cistinúria e homocistinúria, teste da p-nitroanilina para o ácido metilmalônico e teste do azul de toluidina para glicosaminoglicanos. Foi feita análise cromatográfica em camada delgada da urina para presença de glicosaminoglicanos, oligossacarídeos, sialiloligosacarídeos e carboidratos. Também foi feito ensaio quantitativo para aminoácidos em sangue e urina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) quando pelo menos um dos testes de triagem se mostrou positivo ou duvidoso, e quando havia forte suspeita clínica mesmo apresentando resultado normal nos testes de triagem. O Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre participa desde 1999 do Programa de Controle de Qualidade Externo Internacional "European Research Network for Evaluation and Improvement of Screening, Diagnosis and Treatment of Inherited Disorders of Metabolism" (ERNDIM) para análise de ácidos orgânicos e desde 2010 do Programa de Qualidade do "Center for Disease Control and Prevention" (CDC) para análise de acilcarnitinas.

Análise de ácidos orgânicos

A análise de ácidos orgânicos foi realizada baseada no método de Swetman *et al*¹¹. Amostras de urina com volume correspondente a 1 µg de creatinina foram acidificadas até atingirem a faixa de pH entre 0,5-1,0, então, foram adicionados os padrões internos hexadecano e ácido heptadecanóico. Foi adicionado, após, cloreto de amônio e os ácidos orgânicos foram extraídos com acetato de etila duas vezes consecutivas. Em seguida as fases orgânicas foram reunidas e adicionou-se 50 miligramas de sulfato de sódio anidro, a mistura permaneceu em repouso por pelo menos uma hora à temperatura ambiente e, então, foi filtrada em membrana de celulose de 0,2 µm e evaporada em nitrogênio a 60 °C. Foram adicionados, então, 100 µL de etanol e em seguida homogeneizado, centrifugado por 10 minutos e evaporado em nitrogênio novamente. A derivatização foi realizada com 27,5 µL de BSTFA (bis- (trimetilsilil) trifluoracetamida) + 1% TMCS (trimetilclorosilano) e a amostra incubada a 60 °C por 60 minutos. Após a derivatização 0,5 µL da amostra foram injetadas no cromatógrafo gasoso (GC/MS) Varian Saturn 2000 equipado com uma coluna capilar CP-Sil 8 CB (comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0.25 mm, revestimento: 0.25 µm), injetor split e hélio como gás carreador. As temperaturas utilizadas no GC/MS foram as seguintes: injetor 250 °C, coluna 90 °C a 280 °C, com um incremento de 3 °C por minuto, linha de transferência 280 °C, fonte de íons 150 °C e analisador de massas 35 °C. O tempo total de corrida foi de 75 minutos. O espectrômetro de massas foi programado m/z 10–650 e taxa de 0.6 Hz.

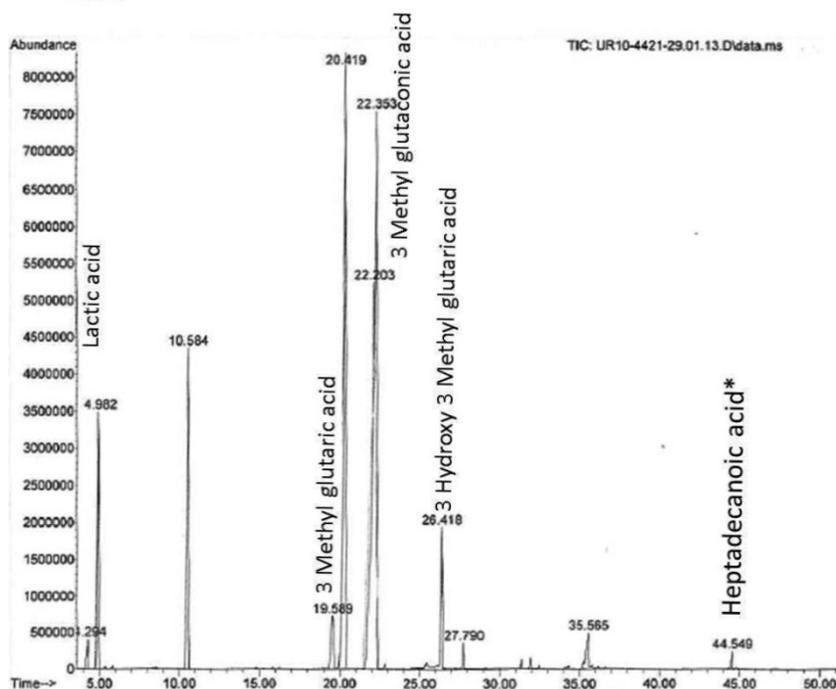
Análise de acilcarnitinas e aminoácidos em tandem

A análise de acilcarnitinas por LC/MS/MS foi realizada baseada no método de Rashed *et al* em amostras de sangue total impregnado em papel filtro. Foram recortados círculos de 3 mm de diâmetro do papel impregnado com sangue seco e acrescentado 100 µL da solução de padrões de acilcarnitinas e aminoácidos marcados com deutério (H²). As amostras foram agitadas e o sobrenadante evaporado com nitrogênio a 50 °C. Para derivatização foram adicionados 60 µL de 3N HCl-butanol e as amostras incubadas a 65 °C por 15 minutos e em seguida foram secas com nitrogênio a 50 °C. Foi, então, realizada a diluição com 100 µL de uma mistura acetonitrila/água milliQ/ácido fórmico (50/50/0,1%) e centrifugação durante 5 minutos. Para injeção no LC/MS/MS foram utilizados 30 µL da mistura com rampa de fluxo utilizando HPLC, fase móvel composta por acetonitrila/água milliQ/ácido fórmico (50/50/0,025%), temperatura da fonte a 120° C, temperatura de dessolvatação a 300° C, energia de entrada 3 V, energia de colisão 16 V e energia de saída 2V.

Resultados

Entre julho de 2008 e julho de 2016, 245 pacientes foram diagnosticados com acidemias orgânica ou defeitos de beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos. Foram realizadas análises de ácidos orgânicos em urina por GC-MS de 8537 pacientes provenientes de vários estados brasileiros, sendo que em 223 (2,61%) foi feito o diagnóstico. Para a análise de acilcarnitinas e aminoácidos em tandem, 7268 pacientes foram analisados e 22 (0,3%) pacientes receberam diagnóstico de doenças metabólicas como acidemias orgânicas e defeitos de beta-oxidação mitocondrial de ácidos graxos. Entre os pacientes diagnosticados 52,24% eram do sexo masculino enquanto o sexo feminino correspondia a 47,75%. Entre os diagnósticos realizados foram identificadas as seguintes doenças metabólicas: 52 pacientes com acidemia láctica, 46 com acidemia glutárica tipo I, 30 com acidemia metilmalônica, 25 com acidemia 3-OH-3-metilglutárica, 14 com deficiência múltipla de acil-CoA desidrogenase, 14 com acidemia isovalérica, 10 com acidemia propiônica, 8 com acidemia L-2-OH-glutárica, 8 com alcaptonúria, 7 com deficiência de 3-OH-acil-CoA desidrogenase de cadeia longa, 7 com acidemia 2-OH-glutárica (forma D ou L), 4 com deficiência de 2-metil-3-hidroxi-butiril desidrogenase, 3 com deficiência de cetotiolase, 3 com doença de Canavan, 3 com acidemia 3-metilglutacônica, 3 com deficiência de glutatona sintetase, 2 com deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa, 1 com deficiência de 3- metilcrotonil-CoA carboxilase, 1 com deficiência de cetotiolase/2-metil-3-hidroxi-butiril desidrogenase, 1 com acidemia mevalônica, 1 com acidemia arginino-succínica, 1 com deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média e 1 com deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (Tabela 1). A figura 1 ilustra um cromatograma de GC-MS do perfil de ácidos orgânicos de um paciente com diagnóstico de acidemia 3-OH-3-metilglutárica.

Figura 1. Cromatograma de GC-MS de ácidos orgânicos na urina de paciente com diagnóstico de acidemia 3-OH-3-metilglutárica.



A média de idade no momento do diagnóstico foi de 4,68 anos (56 meses). Foram observados em 53% dos pacientes anormalidades neurológicas. Os sintomas e achados laboratoriais mais frequentemente apresentados entre os pacientes diagnosticados foram anormalidades neurológicas (53%) acidose metabólica (36%), hipo/hipertonia (23%), vômito (21%), hipoglicemia (20%), dificuldade de alimentação (14%), acidemia láctica (13%) e hepatomegalia (13%) (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1. Doenças metabólicas herdadas diagnosticadas na população investigada

Doença	Número de Pacientes (%)		
	GC/MS	MS/MS	Total
Número de Pacientes Analisados	8537	7268	
Número de Pacientes Diagnosticados	223 (2,61%)	22 (0,31%)	245
Acidemia Láctica	52 (21,22%)	0 (0,00%)	52 (21,22%)
Acidemia Glutárica Tipo I	42 (17,14%)	4 (1,63%)	46 (18,77%)
Acidemia Metilmalônica	29 (11,83%)	1 (0,41%)	30 (12,24%)
Acidúria 3-OH-3-Metilglutárica	23 (9,38%)	2 (0,82%)	25 (10,20%)
Acidemia Isovalérica	12 (4,89%)	2 (0,82%)	14 (5,71%)

Deficiência múltipla de acil-CoA desidrogenase (MADD)	8 (3,27%)	6 (2,45%)	14 (5,72%)
Acidemia Propiônica	9 (3,67%)	1 (0,41%)	10 (4,08%)
Acidemia L-2-OH-glutárica	8 (3,27%)	0 (0,00%)	8 (3,27%)
Alcaptonúria	8 (3,27%)	0 (0,00%)	8 (3,27%)
Acidemia 2-OH-glutárica	7 (2,86%)	0 (0,00%)	7 (2,86%)
Deficiência de 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHADD)	4 (1,63%)	3 (1,27%)	7 (2,86%)
Deficiência de 2-Metil-3-OH-butiril desidrogenase	4 (1,63%)	0 (0,00%)	4 (1,63%)
Doença de Canavan	3 (1,22%)	0 (0,00%)	3 (1,22%)
Acidúria 3-Metilglutacônica	3 (1,22%)	0 (0,00%)	3 (1,22%)
Deficiência de Glutaciona Sintetase	3 (1,22%)	0 (0,00%)	3 (1,22%)
Deficiência de β -cetotilase	3 (1,22%)	0 (0,00%)	3 (1,22%)
Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (VLCADD)	0 (0,00%)	2 (0,82%)	2 (0,82%)
Deficiência de 3-metilcrotonil-CoA-carboxilase	1 (0,41%)	0 (0,00%)	1 (0,41%)
Def. de cetotilase/ 2-metil-3-hidroxi-butiril desidrogenase	1 (0,41%)	0 (0,00%)	1 (0,41%)
Acidemia Arginino-Succínica	0 (0,00%)	1 (0,41%)	1 (0,41%)
Acidúria Mevalônica	1 (0,41%)	0 (0,00%)	1 (0,41%)
Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCADD)	0 (0,00%)	1 (0,41%)	1 (0,41%)
Deficiência de Acil-CoA-desidrogenase de cadeia curta (SCADD)	1 (0,41%)	0 (0,00%)	1 (0,41%)

Tabela 2. Sintomas e achados laboratoriais encontrados no momento do diagnóstico em pacientes diagnosticados com doenças metabólicas herdadas.

Sintoma	%
Achados clínicos	
Anormalidades neurológicas e de RMN	53
Hipo/hiper/distonia	23
Vômito	21
Dificuldade de alimentação	14
Hepatomegalia	13
“Failure to thrive”	7
Dismorfias	5
Achados laboratoriais	
Acidose metabólica	36
Hipoglicemia	20
Acidemia láctica	13
Hiperamonemia	6
Cetose/Cetonúria	3

Tabela 3. Distribuição dos sintomas neurológicos encontrados no momento do diagnóstico em pacientes diagnosticados com doenças metabólicas herdadas

Sintomas Neurológicos	129 (53%)
Atraso DNPM/retardo mental	89 (69%)
Convulsões	66 (51%)
Macrocefalia	48 (37%)
Coma	41 (17%)
Atrofia cerebral	14 (11%)
Encefalite/encefalopatia	6 (5%)
Leucodistrofia	4 (3%)
Letargia	2 (1,6%)
Síndrome extrapiramidal	1 (0,8%)
Surdez	1 (0,8%)
Edema cerebral	1 (0,8%)
Outras anormalidades cerebrais (RMN)	29 (22%)

Discussão

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para análise de ácidos orgânicos na urina é o método de escolha para o diagnóstico de acidemias orgânicas⁸ enquanto que a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS/MS) é o método padrão ouro para análise de acilcarnitinas em sangue total impregnado em papel filtro o qual é o método de escolha para triagem neonatal de acidemias orgânicas e defeitos de beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos. Apesar de ambos os métodos serem de alto custo, fator determinante em países em desenvolvimento como o Brasil, deve-se levar em conta a importância de diagnosticar doenças de alta prevalência entre os EIM como as acidemias orgânicas² e defeitos de beta oxidação. Por outro lado, a espectrometria de massas pode ser utilizada para análise de acilcarnitinas e aminoácidos, permitindo o diagnóstico de defeitos de beta oxidação, e acidemias orgânicas, bem como de aminoacidopatias, sendo a opção mais utilizada internacionalmente para testes de triagem neonatal¹³.

Neste estudo um total de amostras de 8537 pacientes foram submetidos à cromatografia de ácidos orgânicos na urina, resultando em 209 diagnósticos de acidemias orgânicas (acidemia láctica, metilmalônica, propiônica, glutárica tipo I, isovalérica, mevalônica, 3-OH-3-metilglutárica, 2-OH-glutárica, 3-metilglutacônica, 3- metilcrotonil-CoA carboxilase, deficiência de glutatona sintetase, deficiência de cetotiolase, alcaptonuria, deficiência de 2-metil-3-hidroxitubiril, doença de Canavan), além de 13 diagnósticos de distúrbios de beta oxidação mitocondrial (MADD, LCHAD, SCAD). Para análise de acilcarnitinas por espectrometria de massas em tandem foram analisadas amostras de sangue de 7268 pacientes e realizados 22 diagnósticos de EIM, sendo 11 acidemias orgânicas (metilmalônica, propiônica, glutárica I, isovalérica, 3-OH-3-metilglutárica, arginino-succínica) e 11 defeitos de beta oxidação mitocondrial (MADD, LCHADD, MCADD, VLCADD).

As doenças mais frequentemente encontradas foram acidemia láctica (21%), acidemia glutárica tipo I (19%), acidemia metilmalônica (12%) e acidemia 3-OH-3-metilglutárica (10%), dados diferentes dos encontrados em anos anteriores na mesma população alvo de estudo¹³, uma vez que o número de casos aumentou, em especial os de acidemias glutárica tipo I e 3-OH-3-metilglutárica. Ainda, houve aumento do número de casos de defeitos de beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos (VLCAD, MCAD), possivelmente devido à inclusão da análise de acilcarnitinas por espectrometria de massas em tandem na lista de exames realizados pelo hospital. Wajner *et al*¹⁴ diagnosticaram 218 pacientes portadores de acidemias orgânicas em 6866 submetidos a cromatografia de ácidos orgânicos na urina com frequências de 26% para acidemia láctica, 16% para acidemia metilmalônica, 15% para acidemia glutárica tipo I e 8% para acidemia 3-OH-3-metilglutárica em um período de estudo de 15 anos (1994 – 2008).

De acordo com os dados obtidos, a acidemia glutárica tipo I é a segunda acidemia orgânica mais frequentemente diagnosticada na população em estudo. Cabe salientar que a incidência das acidemias glutárica tipo I e 3-OH-3-metilglutárica são maiores nas populações brasileira e portuguesa do que em outros países¹⁵, o que pode estar relacionado à descendência portuguesa no Brasil.

O diagnóstico de MCADD representou apenas 5,5% dos defeitos de beta oxidação e 0,41% das doenças diagnosticadas. Em países como Portugal e Estados Unidos (Carolina do Norte) a representatividade desta doença entre os EIM chega a 26 e 33% respectivamente, superando, inclusive, a incidência de fenilcetonúria (PKU), uma das doenças mais frequentemente diagnosticadas entre os EIM^{16,17}. Pode-se atribuir à baixa incidência de MCADD no presente estudo, a um número considerável de pacientes portadores de MCADD não diagnosticados, com desfecho de morte neonatal súbita. Além desses fatores, ao utilizar amostras de urina coletadas fora do período de descompensação metabólica reduz-se a sensibilidade do diagnóstico por GC-MS, devido à excreção normal dos ácidos dicarboxílicos de cadeia média nestes períodos¹⁸. Neste caso, pode-se fazer o diagnóstico da doença através da análise de acilcarnitinas por LC/MS/MS, que em caso positivo de MCADD demonstra o aumento de octanoilcarnitina (C8) e da relação octanoilcarnitina/decanoilcarnitina (C8/C10). Neste sentido, é possível que alguns casos não tenham sido diagnosticados em nosso estudo, uma vez que a amostra de urina fora da crise metabólica tenha sido coletada ao invés de sangue total em papel filtro do paciente.

A acidemia láctica, doença mais frequente na população estudada, pode ser consequência de mutações nas principais enzimas responsáveis pelo metabolismo do piruvato: complexo da piruvato desidrogenase e piruvato carboxilase. Ambos os defeitos acarretam acúmulo de lactato no sangue, o que pode ser prejudicial para vários órgãos. Além disso, ocorre deficiência de ATP produzido a partir da acetil-

CoA no ciclo de Krebs, o que é prejudicial para o SNC, levando o paciente a desenvolver retardo neuropsicomotor e deficiência cognitiva. O complexo da piruvato desidrogenase é formado por três sub-complexos: (E1) piruvato desidrogenase, (E2) diidrolipoil-transacetilase e (E3) diidrolipoil-desidrogenase, e (E3BP) proteína de ligação de E3. Mutações podem ocorrer em qualquer um dos sub-complexos com prejuízo do metabolismo do piruvato e aumento do lactato sanguíneo. Dentre os diagnósticos de acidemias lácticas realizados, 19% correspondiam a acidemia láctica primária.

Os principais sintomas apresentados pelos pacientes no momento do diagnóstico foram os sintomas neurológicos (53%) seguido de, hipo/hipertonia (23%), vômito (21%), dificuldade de alimentação (14%) e hepatomegalia (13%). Entre os sintomas neurológicos e anormalidades encontradas em exames de ressonância magnética nuclear (RMN), os mais predominantes foram atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (atraso DNPM) (69%), convulsões (51%), macrocefalia (37%), coma (17%) e atrofia cerebral (11%). Os achados laboratoriais mais comuns foram acidose metabólica (36%), hipoglicemia (20%), acidemia láctica (13%), hiperamonemia (6%) e cetonúria (3%). A frequência dos achados laboratoriais e dos sintomas encontrados mostrou-se semelhante ao estudo anterior, com predomínio de sintomas neurológicos entre os pacientes. Um total de 10% dos pacientes analisados tinham pais com algum grau de parentesco.

A média de idade dos pacientes no momento do diagnóstico foi de 4,68 anos (56 meses), podendo-se concluir que a maioria dos diagnósticos ocorreu de forma tardia. Cabe salientar que as acidemias orgânicas e defeitos de beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos devem ser preferencialmente diagnosticados em neonatos. Entretanto, os pacientes do nosso estudo foram diagnosticados após apresentar crises metabólicas, podendo ter acarretado quadros neurológicos irreversíveis. Neste sentido, o médico deve estar atento à possibilidade de seus pacientes serem portadores de EIM e iniciar a investigação diagnóstica o mais cedo possível ao observar sintomas como acidose metabólica, aumento de lactato e hipoglicemia persistente. Deve-se levar em conta também, o escasso número de centros de referência para o diagnóstico de EIM no Brasil que realizam a investigação de doenças metabólicas não cobertas pelo Teste do Pezinho. O Programa de Triagem Neonatal do Ministério da Saúde no Brasil detecta apenas fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, fibrose cística, deficiência de biotinidase, hemoglobinopatias e hiperplasia adrenal congênita.

Desta forma, cabe salientar a importância de exames diagnósticos para doenças metabólicas herdadas, como a cromatografia de ácidos orgânicos acoplada a espectrometria de massas e, em especial, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem, pois permite o diagnóstico de defeitos de beta oxidação mitocondrial de ácidos graxos fora do período de crise metabólica, bem como permitem a realização de triagem neonatal para estas doenças metabólicas.

Referências

1. Scriver R, Beaudet A, Sly ES, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001
2. Villani GR, Gallo G, Scolamiero E, Salvatore F, Ruoppolo M. 'Classical organic acidurias': diagnosis and pathogenesis. *Clin Exp Med*. DOI 10.1007/s10238-016-0435-0, 2016.
3. Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem Neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciênc. saúde coletiva* [Internet]. 2002 [cited 2016 Nov 19]; 7(1): 129-137. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232002000100012&lng=en.
4. Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *J Inherit Metab Dis*. 2006; 29:261–74
5. Wajner, M.; Vargas, C.R.; Burin, M.; Giugliani, R.; Coelho, J. Investigação de Erros Inatos do Metabolismo Porto Alegre-RS/Brasil. *Revista HCPA*. 2001; 3:343- 360.
6. Walterfang M, Bonnot O, Mocellin R, Velakoulis D. The neuropsychiatry of inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2013; 36:687–702.
7. Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB, Caruso U, Sabetta G, Uziel G, Abeni D: Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population:a national retrospective survey. *J Pediatr*. 2002;140:321 – 327.
8. Christou C., Gika HG, Raikos N , Theodoridis G. GC-MS analysis of organic acids in human urine in clinical settings: A study of derivatization and other analytical parameters. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014; 964:195-201.
9. Houten SM, Violante S, Ventura FV, Wanders RJ. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders.*Annu. Rev. Physiol*. 2016; 78:23–44.
10. Gucciardi A, Zaramella P, Costa I, Pirillo P, Nardo D, Naturale M, et al. Analysis and interpretation of acylcarnitine profiles in dried blood spot and plasma of preterm and full-term newborns. *Pediatr Res*. 2015; 77:36-47.
11. Sweetman L. Organic acid analysis. In: Homes FA, editor. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual*. New York: Wiley-Liss; 1991. p. 143.
12. Rashed M, Bucknall M, Little D, Awad A, Jacob M, Alamoudi M, et al. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles. *Clin Chem*, 1997; 43: 1127-1141.
13. Adaway JE, Keevil BG, Owen LJ. Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory.*Annals of Clinical Biochemistry* 2015; 52:18–38.
14. Wajner M, Coelho DM, Ingrassia R, Oliveira AB, Busanello ENB, Raymond K, et al. Selective screening for organic acidemias by urine organic acid GC–MS analysis in Brazil: Fifteen-year experience. *Clinica Chimica Acta*. 2009; 400:77–81
15. Vargas CR, Sitta A, Schmitt G, Ferreira GC, Cardoso ML, Coelho D, et al. Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase (HL) deficiency in Brazil, South America. *J Inherit Metab Dis*. 2008;31 (Suppl 3):S511–S515.
16. Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, Marcão A, Fonseca H, Bogas M, et al. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis*. 2010; 3(Suppl 3):S133 – S138.
17. Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, Koeberl DD, Weavil SD, Chaing SH, et al. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997–2005. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29:76–85.
18. Ventura FV, Leandro P, Luz A, Rivera IA, Silva MFB, Ramos R, et al. Retrospective study of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Portugal. *Retrospective Clin Genet*. 2014; 85:555–561.