

INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS METABÓLICAS HEREDITÁRIAS ATRAVÉS DE TRIAGEM BIOQUÍMICA NA URINA DE PACIENTES

Resumo

As doenças metabólicas hereditárias são afecções genéticas raras, pouco conhecidas entre os médicos e com poucos centros de diagnóstico no país. No Estado do Pará, a investigação dessas doenças é realizada única e exclusivamente pelo Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da Universidade Federal do Pará (LEIM-UFGPA). O LEIM desenvolve inúmeras atividades de ensino, extensão e pesquisa, além de prestar assistência gratuita à comunidade no que tange a investigação de doenças metabólicas hereditárias. O diagnóstico de algumas dessas patologias já foram definidos em pacientes com suspeita de apresentar algum erro inato do metabolismo específico.

Introdução

Em 1986 foi criado o Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (LEIM), localizado no Departamento de Fisiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Várias atividades de ensino, pesquisa e extensão, além de assistência gratuita à comunidade são desenvolvidas no LEIM. O termo "Erro Inato do Metabolismo" (EIM) foi sugerido no início do século XX pelo cientista finlandês Garrod para caracterizar quatro situações que estudava (Alcaptonúria, Albinismo, Pentosúria e Cistinúria). Garrod propôs que essas doenças eram causadas por um bloqueio metabólico e estavam associadas com elevadas taxas de consangüinidade.

Os EIM compreendem um grupo formado por mais de 500 diferentes distúrbios, a maioria envolvido nos processos de síntese, degradação, armazenamento e transporte de moléculas no organismo. Apesar de individualmente raros, os EIM são relativamente freqüentes em seu conjunto, estimando-se que ocorrem 1 em cada 1000 recém-nascido.

O trabalho de Garrod foi sendo enriquecido por dados principalmente clínico-bioquímicos relacionados com os efeitos do acúmulo ou escassez de moléculas, abrindo caminho para o manejo de diversos EIM, especialmente os distúrbios que envolvem moléculas pequenas, bem como para o diagnóstico pré-sintomático através da triagem em massa de recém-nascidos.

Durante as décadas de 60 e 70 do século XX, a genética bioquímica se voltou para a identificação de proteínas, levando à descoberta da maioria das enzimas, que quando deficientes, são responsáveis pelos diferentes EIM. Esta fase permitiu progressos na prevenção primária desses distúrbios metabólicos, através da detecção de portadores e do diagnóstico pré-natal, e no tratamento com técnicas de reposição enzimática e transplante de órgãos.

As técnicas de Biologia Molecular que surgiram com o advento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vêm contribuindo para a identificação das mutações específicas relacionadas a cada distúrbio, permitindo estratégias de correlações clínicas, bioquímicas e moleculares. Esta tecnologia está proporcionando o desenvolvimento de protocolos de Terapia Gênica que poderão ser aplicados futuramente no tratamento de vários EIM.

O recém-nascido que se apresenta normal ao nascimento, após a gravidez normal e que desenvolve deterioração do quadro clínico sem razões óbvias é suspeito de apresentar algum EIM. O intervalo entre o nascimento e o aparecimento de sintomas pode ser de poucas horas ou após algumas semanas, dependendo da natureza do defeito. Nestes pacientes serão realizados exames laboratoriais que vão auxiliar no diagnóstico clínico.

Alguns exames laboratoriais, denominado de Testes Bioquímicos de Triagem, devem ser realizados nos pacientes com suspeita de EIM. Estes procedimentos são geralmente realizados na urina. Apesar de serem rápidos e de baixo custo, os testes de triagem não são determinantes para o diagnóstico dos EIM. Para suplantar esta limitação, a análise quantitativa de metabólitos, o ensaio enzimático e as técnicas de Biologia Molecular representam procedimentos definitivos no diagnóstico dos EIM.

Entre as doenças genéticas os EIM são muito complexos. Por outro lado, muitas vezes são, ao contrário da maioria das doenças genéticas, possíveis de serem tratadas (cerca de 40,0% dos EIM têm tratamento). De uma maneira geral, o tratamento é tanto mais bem sucedido quando mais precoce for o diagnóstico. As dificuldades para o diagnóstico incluem a escassez de sinais e sintomas específicos e a relativa complexidade dos métodos de detecção. Quando não possibilita a instituição de medidas terapêuticas, o diagnóstico permite uma abordagem preventiva, que inclui o aconselhamento genético, detecção de heterozigotos (portam um dos alelos mutantes) e, em muitos casos, o diagnóstico pré-natal.

Justificativa

A melhoria de condições de saúde ocorrida nas sociedades industriais, nos últimos 100 anos, modificou o perfil das doenças pediátricas, diminuindo a participação relativa das doenças infecciosas e nutricionais. As doenças com componente genético são responsáveis pela ocupação de cerca de 50,0% dos leitos pediátricos nos países desenvolvidos do Hemisfério Norte. Embora no Brasil, e em particular no Estado do Pará, sejam muito mais prevalentes as doenças decorrentes da pobreza e do subdesenvolvimento, convém lembrar que os EIM existem e não serão diagnosticados se o pediatra e um laboratório especializado não estiverem alerta para essa possibilidade diagnóstica. Mesmo que seja discutível a oportunidade de criar estes testes compulsórios no Estado do Pará, no qual há preponderância de fatores ambientais na etiologia da deficiência mental (um dos sintomas principais de vários EIM), a implantação de programas deste tipo desperta o interesse dos profissionais envolvidos e da comunidade no assunto, além de permitir que os serviços envolvidos testem a metodologia e se preparem para aplicá-la, já com experiência, no futuro.

Considerando as características dos EIM, a atenção a este problema poderia partir do diagnóstico de pacientes com EIM em populações de alto risco (famílias com um caso de EIM diagnosticado), possibilitando a identificação de grupos familiares em risco, às quais são oferecidas as medidas terapêuticas e preventivas disponíveis. A integração de uma equipe especializada, contando com o apoio de instituições governamentais, proporcionará a formação de um grupo atuante nesta

área do conhecimento, economizando investimentos e auxiliando na qualidade de vida da população do Estado do Pará.

Objetivos

- Objetivo principal:

O presente trabalho tem como eixo principal a investigação e detecção gratuitamente de doenças pertencentes ao grupo dos Erros Inatos do Metabolismo na População do Estado do Pará, através de procedimentos integrados clínico-bioquímico-moleculares em seres humanos, os quais contribuirão para a determinação do perfil epidemiológico e um melhor entendimento da patogênese deste grupo de doenças genético-metabólicas.

- Objetivos específicos:

a) Implantar mecanismos educacionais (cursos, palestras, seminários e oficinas) que levem à conscientização de profissionais da área da saúde do Estado do Pará sobre a existência e as conseqüências dos Erros Inatos do Metabolismo.

Plano de Metas:

1. Padronização de técnicas empregadas na detecção de EIM;
2. Treinamento de alunos de graduação para a realização das técnicas;
3. Divulgação das atividades desenvolvidas pelo grupo para as instituições e profissionais da área de saúde;
4. Treinamento de profissionais da área da saúde através de cursos teóricos-práticos, palestras, seminários e oficinas coordenados pelo grupo;
5. Avaliação dos princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos;
6. Localização e recrutamento de pacientes com suspeita clínica encaminhados pelos serviços médico-hospitalares do Estado do Pará;
7. Coleta de material biológico (sangue e/ou urina);
8. Estudos clínico-genéticos;
9. Estudos bioquímicos: análise qualitativa e quantitativa de metabólitos, ensaios enzimáticos;
10. Estudos moleculares: identificação e caracterização de mutações no gene dos pacientes;
11. Estabelecimento da correlação genótipo-fenótipo (clínico-molecular);
12. Estabelecimento do perfil epidemiológico dos EIM no Estado do Pará.
13. Elaboração de um manual laboratorial básico sobre os EIM.

Material:

a) Amostra:

Os pacientes são encaminhados por serviços médico-hospitalares, sendo previamente informados da existência de um laboratório de referência para a análise dos Erros Inatos do Metabolismo.

b) Aspectos éticos:

Este trabalho considera os princípios éticos básicos das diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça.

c) Preparação das amostras para análise:

O sangue e a urina são os materiais biológicos rotineiramente analisados. Desta forma, são colhidos 20 a 30mL de urina (frasco contendo a urina envolvido em papel alumínio imediatamente após a coleta) destinados a técnicas que utilizem este material biológico (triagem bioquímica na urina, cromatografias, entre outros), 5 a 10 mL de sangue em seringa heparinizada para a obtenção de plasma e leucócitos destinados a procedimentos como cromatografia, análise de metabólitos e ensaio enzimático e 5 a 10 ml de sangue com EDTA para a extração de DNA, o qual será analisado por métodos de Biologia Molecular.

Métodos:

a) Estudos clínicos-genéticos:

Os pacientes com suspeita de apresentarem EIM e seus familiares são encaminhados para avaliação clínica. Nesta ocasião, é realizado o exame físico nos indivíduos afetados. Os dados relativos à história pré, peri e pós-natal, assim como, os resultados dos exames já realizados são devidamente registrados. São também obtidas informações sobre a história familiar (ocorrência de outros casos, presença de consangüinidade), origem étnica dos casos, idade, sexo e local do nascimento dos pacientes.

b) Estudos bioquímicos:

Nestes pacientes são realizados exames laboratoriais que vão auxiliar no diagnóstico clínico. Os exames preliminares, como a determinação do pH do sangue e da urina, testes de função hepática, testes de função renal, hemograma, hemocultura e outros, representam o ponto de partida para a investigação dos EIM.

Em uma segunda etapa, testes bioquímicos de triagem no sangue e na urina (teste da p-nitroanilina para a Acidose Metilmalônica, cromatografia usado na detecção de aminoacidopatias, como a fenilcetonúria e a tirosinemia) devem ser realizados nos indivíduos com suspeita de algum EIM. Finalmente, exames bioquímicos específicos, como a análise quantitativa de metabólitos e o ensaio enzimático, serão usados como as ferramentas definitivas para o diagnóstico e o acompanhamento de pacientes com um EIM específico.

c) Estudos moleculares:

Um banco de DNA está sendo formado a partir da extração de DNA das amostras de sangue dos pacientes com EIM.

d) Estudos epidemiológicos:

Os estudos clínicos, genéticos, bioquímicos e moleculares auxiliarão na determinação da frequência dos EIM na população do Estado do Pará.

e) Correlação genótipo-fenótipo:

erá estabelecida uma estratégia de correlacionar as alterações moleculares aos dados bioquímicos medidos e à evolução clínica dos pacientes.

Resultados e Impacto Esperados:

O Estado do Pará apresenta uma certa carência na área de saúde em relação a equipes especializadas no diagnóstico e tratamento de determinados grupos de doenças. Em muitos casos, as amostras biológicas dos pacientes com suspeita clínica de EIM são enviadas para serviços (públicos e/ou privados) localizados nas regiões Sudeste e Sul do Brasil.

Levando em consideração as limitações sócio-econômicas e técnico-científicas, os resultados obtidos a partir do nosso trabalho visam principalmente:

1. Consolidação de um grupo especializado na triagem, detecção e tratamento dos EIM, resolvendo gradativamente este problema do Estado do Pará e determinando uma estratégia para o atendimento e recrutamento de pacientes com suspeita ou risco de apresentarem EIM;
2. Identificação de novas informações para a compreensão da patogênese dos EIM, contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias;
3. Identificação dos EIM mais freqüentes na população do Estado do Pará;
4. Identificação, quando possível, das mutações mais freqüentes causadoras dessas doenças, permitindo auxiliar na determinação dos mecanismos responsáveis pela origem destas alterações gênicas em nosso meio;
5. Correlação dos achados moleculares (genótipo) com os quadros bioquímicos e clínicos dos pacientes, o que deverá contribuir para um melhor entendimento da etiopatogenia dessas doenças.

Pretende-se realizar uma grande divulgação das atividades deste estudo através de meios de comunicação apropriados e direcionados aos profissionais da área da saúde e à comunidade em geral. Desta forma, nossa equipe estará apta a iniciar suas atividades e propiciar à população do Estado do Pará a realização de testes bioquímicos de triagem, detecção e tratamento, quando disponível, para vários EIM.

Pretende-se ainda, elaborar um guia básico laboratorial preparado pelos bolsistas de iniciação científica e estagiários do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo. Este guia será uma espécie de manual de consulta integrando a bioquímica com o quadro clínico dos pacientes. Nele constará como são realizados os testes de triagem para a detecção de vários EIM, assim como, o tratamento e o diagnóstico definitivo para este grupo de doenças. O guia apresentará também uma visão panorâmica dos EIM mais freqüentes, enfatizando as rotas bioquímicas envolvidas, os aspectos clínicos principais e a aplicação das recentes descobertas da biologia molecular para a terapêutica destas doenças.

Nossos Resultados:

Até o mês de agosto de 2003 foram realizadas 9253 testes de triagem bioquímica na urina de 1024 pacientes com suspeita de EIM. O diagnóstico definitivo foi obtido em 1,8% dos pacientes (18/1024). Foram encontrados 09 pacientes com Mucopolissacaridose, 05 com Fenilcetonúria, 01 com Galactosemia, 01 com Leucodistrofia Metacromática, 01 com Doença de Niemann-Pick e 01 com Tirosinemia.

Ficha Técnica

Instituição

Universidade Federal do Pará

Professor(es) orientador (es)

Dr. Luiz Carlos Santana da Silva.

Rua Caripunas, 3660 / Apto. 201 - Edifício Primavera
Cremação
Belém -PA
66063-040
(91) 211-1572
e-mail: icss@ufpa.br

Aluno(s) responsável(is)
Rodrigo Oliveira Lauande
Aluno(s) responsável (is) para contato:
Travessa Mariz e Barros, 1350. - Apto 1504
Pedreira
Belém - PA
66080-660
(91) 8801-8638
E-mail: rodrigoolauande@hotmail.com