

Capa

**REVISTA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Este periódico é um órgão de divulgação científica e tecnológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, área hospitalar e de saúde pública para a Faculdade de Medicina e a Escola de Enfermagem da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Presidente:

Prof. SÉRGIO CARLOS EDUARDO PINTO MACHADO

Vice-Presidente Médico:

Prof. CARLOS ALBERTO SOUZA MACEDO

Vice-Presidente Administrativo:

Prof. CARLOS ALBERTO PROMPT

Coordenadora do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Profa. THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA

Coordenadora do Grupo de Enfermagem:

Profa. MARIA DA GRAÇA CROSSETTI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Reitora:

Profa. WRANA MARIA PANIZZI

**FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Diretor:

Prof. WALDOMIRO CARLOS MANFROI

**ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Diretora:

Profa. IDA DE FREITAS XAVIER

Editor:

Prof. Eduardo Pandolfi Passos

Conselho Editorial:

Prof. Carlos Alberto Prompt
Prof. Cléber Dario Pinto Kruehl
Prof. Elvino Barros
Profa. Ida de Freitas Xavier
Prof. Jefferson Pedro Piva
Prof. João Pedro Marques Pereira
Prof. Jorge Pinto Ribeiro
Prof. José Antônio Magalhães
Prof. José Roberto Goldim
Prof. Luiz Fernando Jobim
Prof. Luiz Lavinsky
Prof. Luiz Roberto Stigler Marczyk
Profa. Maria da Graça Crossetti
Profa. Maria Isabel Albano Edelweiss
Profa. Mirela Jobim de Azevedo
Profa. Nadine Clausell
Prof. Paulo Silva Belmonte de Abreu
Prof. Pedro Gus
Prof. Renato Procyanoy
Prof. Roberto Ceratti Manfro
Prof. Roberto Giugliani
Prof. Rogério Friedman
Prof. Sady Selaimen Costa
Prof. Sérgio Carlos Eduardo Pinto Machado
Prof. Sérgio Hofmeister Martins-Costa
Prof. Sérgio Menna-Barreto
Prof. Sérgio Pinto Ribeiro
Profa. Sílvia Regina Rios Vieira
Profa. Themis Reverbel da Silveira
Prof. Walter José Koff

Editores Anteriores:

Prof. Nilo Galvão - 1981 a 1985
Prof. Sérgio Menna Barreto - 1986 a 1992
Prof. Luiz Lavinsky - 1993 a 1996

Impressão:

Gráfica La Salle

Editoração:

Contexto Marketing Editorial

Consultoria Editorial:

Scientific Linguagem

Indexação / Índice:

Romilda A. Teofano

Capa:

Reprodução de aquarela, autoria de Alberto Scherer, gentilmente cedida para a editoria da Revista HCPA

© HCPA

Revista HCPA - VOLUME 21 - Nº3 - Dezembro de 2001
International Standard Serial Numbering (ISSN) 0101-5575
Registrada no Cartório do Registro Especial de Porto Alegre sob n. 195 no livro B, n. 2
Indexada no LILACS e na Excerpta Médica

A correspondência deve ser encaminhada para: Editor da Revista HCPA - Largo Eduardo Zaccaro Faraco - Rua Ramiro Barcelos, 2350
90035-003 - Porto Alegre, RS - Tel. +55-51-3332 8324 - www.hcpa.ufrgs.br/revista

**A Revista HCPA é PRODUZIDA E DISTRIBUÍDA SOB A RESPONSABILIDADE DA
FUNDAÇÃO MÉDICA DO RIO GRANDE DO SUL.**

EDITORIAIS

Diálogo científico

Dr. Eduardo P. Passos 263

Nova era da medicina genômica

Dr. Moacir Wajner, Dr. Roberto Giugliani 265

ARTIGOS ORIGINAIS

Aetiological evaluation of mental retardation in Brazilian patients

Têmis M. Félix, Júlio C. L. Leite, Sharbel W. Maluf, Janice C. Coelho 267

Evaluation of genomic instability and cancer prevention

Sharbel W. Maluf, Mariluce Riegel, Silvio L. W. Almeida Jr, Janaína E. Dorfman, Gisele B. Trombeta, Alexandre Bacelar, Bernardo Erdtmann 276

Selective screening of 18,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism

Janice C. Coelho, Maira G. Burin, Moacir Wajner, Carmem R. Vargas, Fernanda T. S. Souza, Roberto Giugliani 286

Programa de monitoramento de defeitos congênitos: experiência do estudo colaborativo latino-americano de malformações congênitas no HCPA

Júlio César L. Leite, Nina R. Stein, Liliam P. Troviscal, Roberto Giugliani 294

Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas

Maria T.V. Sanseverino, Rejane Kessler, Maira G. Burin, Nina R. Stein, Rafaela F. Herman, Ursulo Matte, Patrícia M. M. Barrios, José A. Magalhães 301

Transjugular liver biopsy: experience with the trucut needle

Antonio C. Maciel, Edson Marchiori, Sérgio G. S. Barros, Carlos T. S. Cerski, Dorvaldo P. Tarasconi, Darcy O. Ilha 317

ARTIGOS ESPECIAIS

Protocolos laboratoriais de análise molecular para investigação de doenças genéticas

Maria L. S. Pereira, Sandra Leistner, Úrsula Matte 321

Aplicação da biologia molecular no diagnóstico de doenças genéticas <i>Sandra Leistner, Maria L. S. Pereira, Ângela A. Fachel, Antônio C. Burlamaque-Neto, Carla Streit, Liana Morari, Luciane C. Lima, Luiz C. S. da Silva, Márcia G. Petry, Tiago S. Carvalho, Úrsula Matte</i>	329
Investigação de erros inatos do metabolismo <i>Moacir Wajner, Carmen R. Vargas, Maira Burin, Roberto Giugliani, Janice C. Coelho</i>	343
Avaliação de teratógenos potenciais na população brasileira: a experiência do Sistema Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos em Porto Alegre (SIAT) <i>Lavínia Schüller-Faccini, Maria T. V. Sanseverino, Rossana M. Peres</i>	361
Exposição a contaminantes ambientais durante a gestação e seus efeitos sobre a saúde fetal: uma revisão de literatura <i>Rossana M. Peres, Maria T. V. Sanseverino, Lavínia Schüller-Faccini</i>	368
Terapia gênica: uma nova estratégia para o tratamento de doenças <i>Cláudia D. da Silva, Úrsula da Silveira Matte, Roberto Giugliani</i>	379
Estratégias de tratamento para os erros inatos do metabolismo <i>Carolina F. M. Souza, Claudia R. Cecchin, Gustavo H. B. Maegawa, Denise I. Zandoná, Ricardo F. Pires</i>	387
NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	397
GUIDELINES FOR MANUSCRIPT SUBMISSION	400
INDICE REMISSIVO 2001	407

Diálogo científico

O último número de 2001 da *Revista HCPA* apresenta artigos da área de Genética, organizados pelo nosso Editores Associados, Prof. Moacir Wajner e Prof. Roberto Giugliani. Com o seu auxílio, reunimos uma série de trabalhos originais, que trazem informações pertinentes aos profissionais médicos de uma forma ampla. E creio firmemente que objetivo ambicionado - de que a Revista HCPA continue a ser um instrumento de diálogo científico, um estímulo à produção continuada, mas também ser uma fonte de informações práticas para seus leitores - foi atingido.

Os trabalhos e seus autores estão ligados ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que é talvez o mais adequado centro do gênero na América Latina. O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas atua com mais intensidade nas pesquisas relacionadas com doenças genéticas e malformações congênitas. Além da linha de investigação em erros inatos do metabolismo, desenvolve pesquisas sobre riscos teratogênicos de agentes ambientais, fatores de risco para defeitos congênitos, genética do câncer, biologia molecular das doenças genéticas, etc. Entre os temas abordados neste número encontramos aconselhamento genético, citogenética molecular, erros inatos do metabolismo, diagnóstico pré-natal e terapia gênica, e outros.

Com o término de mais um volume, renovamos nosso convite para a participação na *Revista HCPA*. Participe!

Scientific dialogue

In its last issue of 2001, *Revista HCPA* presents articles on Genetics, organized by the Associate Editors, Professor Moacir Wajner and Professor Roberto Giugliani. He helped us to gather several original studies that generally contain

relevant information for physicians. I firmly believe that we achieved our goal, which is to maintain Revista HCPA as an instrument for scientific discussion that stimulates continuous scientific production, but also as a source of practical information for its readers.

The authors of the articles work at the Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, which is one of the most appropriate centers of Genetics in Latin America. The Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas focus the attention of its researches on genetic diseases and congenital malformations. In addition to the investigation of inborn errors of metabolism, it also develops researches about teratogenic risks of environmental agents, risk factors for congenital defects, genetics of cancer, molecular biology of genetic diseases, etc. Among the subjects approached in this issue, we present genetic advice, molecular cytogenetics, inborn errors of metabolism, prenatal diagnosis, genetic therapy, and more.

As we finish one more issue, we would like to invite you again to make a contribution to *Revista HCPA*. Be part of it!

Dr. Eduardo Pandolfi Passos

Editor

Nova era da medicina genômica

A importância do conhecimento na área de genética para a compreensão das enfermidades humanas tem crescido de modo geométrico nos últimos anos. As informações emergentes sobre a estrutura do DNA, a organização dos cromossomas, o funcionamento dos genes as complexas interações entre eles e com os fatores ambientais, sintetizados de forma emblemática no Projeto Genoma Humano, têm atraído um interesse cada vez maior dos médicos para o campo da genética.

As doenças genéticas costumam ser classificadas como cromossômicas, mendelianas e multifatoriais. As doenças cromossômicas, relacionadas com alterações no número ou na estrutura dos cromossomos, eram consideradas quase completamente conhecidas, até que técnicas recentes de citogenética molecular inundaram a área com novas informações e novas dúvidas. As doenças mendelianas (ou monogênicas), individualmente raras, mas que em seu conjunto incluem mais de 10 mil traços distintos, representam um desafio mesmo para o médico especialista. Mas é no campo das doenças multifatoriais, que inclui as doenças humanas mais comuns, que está a maior dificuldade de entendimento, em função da complexa e variável interação entre os fatores genéticos e ambientais.

Deve-se destacar a importância cada vez mais reconhecida dos fatores genéticos no câncer, decorrente dos avanços recentes na citogenética e no mapeamento e seqüenciamento de oncogenes e de genes supressores de tumor, permitindo prever, para um futuro muito próximo, novas e eficazes abordagens para tratamento e prevenção das neoplasias.

O estudo das função e da estrutura das mitocôndrias (que tem um genoma próprio, independente do localizado no núcleo) revelou nos últimos anos que as doenças mitocondriais (muitas herdadas de modo não mendeliano exclusivamente a partir da linhagem genética materna) podem se refletir em alterações de qualquer órgão ou tecido, geralmente com predominância do cérebro, músculo cardíaco e esquelético (encefalomiocardiopatias).

de defeitos congênitos, diagnóstico pré-natal, diagnóstico de doenças genético-metabólicas), concluindo com um artigo sobre a nova técnica de tratamento de doenças que representa uma das grandes promessas da medicina para os próximos anos (terapia gênica).

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que abriga os autores dos artigos deste fascículo, é provavelmente o mais completo centro do gênero da América Latina, oferecendo de forma integrada assistência clínica a pacientes ambulatoriais e internados, técnicas laboratoriais para diagnóstico citogenético, bioquímico e molecular de doenças genéticas, programas de diagnóstico pré-natal, informação teratogênica, monitoramento de defeitos congênitos e genética do câncer, disponibilizando um programa de formação de recursos humanos que inclui estágios para acadêmicos e graduados, residência em genética médica, mestrado e doutorado, bem como atividades de educação continuada e um programa de divulgação para a comunidade.

Moacir Wajner
Roberto Giugliani
Editores Associados

Aetiological evaluation of mental retardation in Brazilian patients

Têmis M. Félix¹, Júlio C. L. Leite¹,
Sharbel W. Maluf¹, Janice C. Coelho¹

INTRODUCTION: Mental retardation is present in approximately 2-3 % of the population. Clinical geneticists are frequently asked to evaluate children with development delay or mental retardation. Identifying the cause of the mental retardation will benefit individuals and families, answering questions about management, prognosis, recurrence risks and prevention.

MATERIAL AND METHODS: A genetic diagnostic survey in a population of 260 mentally retarded institutionalized patients in the South of Brazil is presented.

RESULTS: The patients had a male:female ratio of 1.3:1 and their ages varied from 1 month to 47 years with a mean of 5 years and one month. Using personal and family data, careful clinical examination and laboratory investigation, the authors established a definitive diagnosis in 171 patients (65.76%). A constitutional disorder was present in 147 patients (56.53%).

CONCLUSION: Down syndrome patients represented 32.30% and 3,84% had other chromosomal anomalies, including microdeletion syndromes. In 32 patients (12.30%) a mendelian inheritance disorder was diagnosed. In eleven patients (4.23%) a MCA/MR syndrome was recorded. Ten patients (3.84%) presented a CNS malformation. An acquired condition was observed in 26 patients (10%), representing 7.69 % of CNS dysfunction, 2.3% of pre- or postnatal infection and 0.4% of postnatally acquired conditions other than infections. In the remaining 87 patients (34.46%) a conclusive diagnosis was not possible.

Key-words: Genetics of mental retardation; etiologia, MCA/MR syndromes, syndromes.

Avaliação etiológica da deficiência mental em pacientes brasileiros

INTRODUÇÃO: Retardo mental está presente em aproximadamente 2-3% da população. Geneticistas clínicos são chamados freqüentemente para avaliar crianças com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor ou deficiência mental. A identificação da causa da deficiência mental irá beneficiar o indivíduo e famílias, respondendo questões sobre manejo, prognóstico, risco de recorrência e prevenção.

MATERIAL E MÉTODOS: Análise genético-clínica numa população de 260 deficientes mentais de uma instituição é apresentada.

RESULTADOS: Os 260 pacientes distribuíram-se numa razão de 1.3 do sexo masculino para 1 do sexo feminino. A idade variou de 1 mês a 47 anos com a mediana de 5 anos e um mês. Usando dados pessoais e familiares, exame físico detalhado e investigação laboratorial, os autores estabeleceram diagnóstico definitivo em 171 pacientes (65,76%). Alterações constitucionais estavam presentes em 147 pacientes (56,53%).

CONCLUSÃO: Pacientes com Síndrome de Down representaram 32,20% e 3,84%

¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondence: Dr. Têmis Maria Félix, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Fax: +55-51-33168010; e-mail: tfelix@hcpa.ufrgs.br

apresentaram anomalias envolvendo outros cromossomos, incluindo síndromes de microdeleção. Em 32 pacientes (12,30%) uma doença mendeliana foi diagnosticada. Em 11 pacientes (4,23%) uma anomalia congênita múltipla/retardo mental (ACM/RM) foi diagnosticada. Dez pacientes (3,84%) apresentaram uma malformação do sistema nervoso central (SNC). Uma condição adquirida foi observada em 26 pacientes (10%), representando 7,69% de disfunção do SNC, 2,3% de infecção pre ou pós-natal e 0,4% de dano pós-natal, excluindo infecções. Em 87 pacientes (34,46%) não foi possível determinar um diagnóstico.

Unitermos: Genética da deficiência mental; etiologia; síndromes de ACM/RM; síndromes.

Revista HCPA 2001(3):267-275

Introduction

Mental retardation (MR) is present in approximately 2-3% of the population in industrialized countries. The prevalence of severe mental retardation was estimated as 3-5.8/1000 in Europe and the United States of America (1). In developing countries the prevalence is higher. In Pakistan the incidence of severe mental retardation was reported as 11/1000 live births (2). In Brazil, it had been estimated as 6.7/1000 (3).

Clinical geneticists are frequently asked to evaluate children with development delay or mental retardation. Identifying the cause of the mental retardation will benefit individuals and families, answering questions about management, prognosis, recurrence risks and prevention (4).

The causes of MR have been studied mainly in developed countries. Several diagnostic-genetic surveys of institutes for mentally retarded have been published specially in Belgium, Dutch and American institutions (5-12).

Until 1998 there was no similar studies in Brazil. In 1998 the authors reported a diagnostic survey in 202 patients in an institution for mentally retarded individuals in the south of Brazil (13). In the present study the authors report an update of the previous study.

Material and methods

During the period from 1989 to 2001, 260 mentally retarded patients were evaluated at the Medical Genetics Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, in the south of Brazil. All these patients were from an institution for mentally retarded individuals, the Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), located

in Caxias do Sul, 122 km far from Porto Alegre. Caxias do Sul is an industrial city of 360 thousand inhabitants, mainly of Italian origin. The institution was founded in 1957 and functions as a reference for the assistance of mentally retarded. It includes an early intervention program with stimulation in motor function, cognitive and language development, special education and professional training. The majority of the individuals (238 patients) were severely mentally retarded. Twenty-one were ascertained as mild mentally retarded and in one patient the degree of mentally handicap could not be established. Their ages varied between 1 month and 47 years, with a mean of 5 years and one month. The male:female ratio was 1.3:1.

Personal and medical histories were recorded, and clinical examination was performed with special attention to dysmorphology in all patients (4).

Chromosomal analysis was performed in all patients. FISH studies were performed when a microdeletion syndrome was suspected. Metabolic screening was chosen based on the presence of suggestive clinical and physical findings. Additional technical examination such as X-ray skeletal survey, computerized axial tomography, magnetic resonance imaging, electroencephalography and electromyography were performed which were necessary to contribute to a more precise diagnosis.

The classification used for etiological factors in this mentally retarded population was the same proposed in Belgian reports (7). This was used to classify patients into 5 main categories: constitutional disorders (chromosomal anomalies, mendelian inheritance

disorders, multiple congenital anomalies/mental retardation (MCA/MR) syndromes and CNS malformations); acquired CNS dysfunction due to pre, peri and postnatal origin; patients with pre- or postnatal infection; postnatal acquired conditions and non-classified conditions.

Results

Constitutional Disorders

In 147 patients (56.53%) a constitutional disorder was found to be the cause of mental retardation.

1. Chromosomal anomalies: In 94 patients a chromosomal anomaly was detected. Eighty four patients had Down syndrome. The karyotype was performed on 79 patients. In 73 patients a regular trisomy 21 was detected, three showed a mosaic constitution and three an unbalanced translocation. The mean maternal age for 73 patients with regular trisomy 21 was 33.59 years (SD= 7.9). Of the other 5 patients, a marker chromosome was detected in two, a partial duplication for chromosomes 8 and

10 in two and a deletion of the short arm of chromosome 18 in the remaining (table 1). In 5 patients a microdeletion syndrome was diagnosed by molecular cytogenetics analysis. A paternal 22q11.2 deletion was detected in the Velocardiofacial syndrome patient by FISH and molecular analysis. A paternal 7q11.23 deletion that includes the ELN gene was diagnosed by molecular analysis in one Williams syndrome patient. A maternal 15 q deletion was diagnosis in three patients with Angelman syndrome (table 2);

2. Mendelian disorders: In 32 patients a mendelian inherited mental retardation syndrome was detected. In table 3 they were listed according to the number in McKusick’s catalogue (14). The achondroplasia patient had hydrocephalus and mental retardation. The hypothyroidism patient was born from consanguineous parents. The mother and brother from the child with autosomal dominant microcephaly were also affected. Fragile X syndrome was diagnosed by molecular studies. Four patients with X linked mental retardation were fragile X negative by molecular analysis;

Table 1. Chromosomal anomalies^a

Abnormality	n
Down syndrome	84
47,+21	73
47,XX +21/46,XX or 47,XY +21/46,XY	3
46,XX der(14;21)	1
46,XX der(21;21)	1
46, XX der (21;22)	1
without karyotype	5
Others	5
47,XY, +mar	2
46,XX, 8p+	1
46,XX, 10q+	1
46,XX, 18p-	1

^a n = 89.

3. Malformation syndromes: Eleven patients with multiple congenital anomalies and mental retardation with unknown transmission were recorded (table 4);

4. CNS malformation: The central nervous system malformations detected in 10 patients are listed in table 5.

Central nervous system dysfunction of prenatal, perinatal or postnatal origin (except infections)

A well-delineated prenatal, perinatal or postnatal cause was recorded in 20 patients (7.69%), as listed in table 6. In two, complications

Table 2. Microdeletion syndromes^a

Syndrome	n
Angelman	3
Williams	1
Velo cardio facial	1

^a n = 5

Table 3. Mendelian disorders^a

McKusick's number	Syndrome	n
Autosomal Dominant		10
191100	Tuberous sclerosis	2
122470	Cornelia De Lange syndrome	2
160900	Myotonic Dystrophy	1
101200	Apert syndrome	1
100800	Achondroplasia	1
12940	Rapp-Hodgkin syndrome	1
156580	Microcephaly	1
	Familial macrocephaly	1
Autosomal Recessive		5
230400	Galactosemia	1
249800	Metachromatic leucodystrophy	1
251200	Microcephaly	2
210600	Seckel syndrome	1
-	Hypothyroidism	1
X-linked		17
309550	Fragile X syndrome	9
304100	Agenesis of corpus callosum	2
309000	Lowe oculocerebrorenal syndrome	1
305100	Ectodermal dysplasia hypohidrotic	1
-	X- linked mental retardation	4

^a n = 32.

secondary to prematurity were recorded. One patient was born with 31 weeks of gestation and evolved with severe perinatal complications. Six children were delivered from twin pregnancies. In two out of the 6 twins, the other twin was a stillbirth.

patient with congenital toxoplasmosis. In two patients (TORCH infection), 3 and 4 years-old respectively, multiple periventricular calcifications were observed on CT scan. Both had normal eye examination and conclusive ORCH 1ters, as these exams were not performed at birth.

Pre or postnatal infections

Five patients (2.30%) with well-defined pre- or postnatal infections are listed in table 7. The cause of prenatal infection was only established in one

Postnatally acquired conditions

One patient (0.4%) was diagnosed as mentally retarded with cranio-encephalic trauma, after a car accident.

Table 4. Malformation (MCA/MR) syndromes with unknown transmission^a

Mckusick's number	Syndrome	n
130650	Beckwith-Wiedemann syndrome	1
150230	Langer-Giedion syndrome	1
216550	Cohen syndrome	1
269700	Berardinelli lipodystrophy syndrome	1
-	Charge association	1
-	Genito-branquio- skeletal syndrome	1
-	MCA/RM and craniosynostosis	1
-	MCM/RM syndrome	2
-	Sensorineural deafness + mental retardation	2

^a n = 11.

Table 5. CNS malformations^a

Malformation	n
Hydrocephaly	4
Schizencephaly	2
Dandy Walker malformation	1
Corpus callosum agenesis	2
Neural tube defect	1

^a n = 10.

Table 6. CNS dysfunction due to prenatal or postnatal origin^a

Condition	n
Prenatal origin	n = 6
Twining	6
Perinatal origin	n = 13
Anoxia	11
Prematurity (< 37 weeks)	2
Postnatal origin	n = 1
Kernicterus	1

^a n = 20.

Non-classified conditions

In 87 patients (34.46%) the cause of mental retardation could not be established. The majority were mentally retarded patients with a normal phenotype and no family history of mental retardation. In table 8 the clinical findings of the patients with some abnormality in the personal or family history or physical examination are listed. Eleven patients had a mentally retarded parent or sibling. Six patients were born from a consanguineous marriage, but no specific diagnosis of an autosomal recessive disorder could be established. Eleven patients had seizures suggesting a CNS dysfunction.

Discussion

A clinical genetic approach was used in 260 patients coming from an institution for mentally retarded with the aim of establishing an etiologic cause for their impairment. With a mean age of 5.1 years this population is younger than in many institutions where the average age was 45 years (11). Therefore in some institutions where the population is younger, the majority of the individuals were from 0 to 9 years old (9). In APAE of Caxias do Sul, since the majority of facilities is guided to children, they are preferably admitted. The male:female ratio of this population was 1.3:1. This is in accordance with the prevalence in the general population, which is higher in boys than in girls, ranging from 1.3:1 to 2.1:1. (15).

Table 7. Pre- or postnatal infections^a

Infection	n
Prenatal infection	n = 3
Toxoplasmosis	1
TORCH infection	2
Postnatal infection	n = 2
Meningo-encephalitis	2

^a n = 5.

Table 8. Clinical findings in non-classified patients^a

Clinical findings	n
Family history of mental retardation	11
Consanguinity	6
Twinning	4
Seizures	11
Dysmorphism	8
Deafness	2

^a n = 87.

Personal and family data were recorded and a clinical examination was performed with special interest in dysmorphism. Laboratory tests such as karyotype and metabolic screening were performed. Further auxiliary investigation such as X-rays and CT scan were performed if necessary.

With this approach a definitive diagnosis was recorded in 171 patients (65.76%). A constitutional disorder was observed in 147 patients (56.53%). A chromosomal disorder was recorded in 34.23% of the total population. Down syndrome accounted for 32.30% of the population and the other autosomal anomalies for 3.84%, including microdeletion syndromes. The frequency of chromosomal anomalies was similar to the ones observed by Gustavson et al. (32%) and Laxova et al. (32.2%), reported in 1977 (5,6). In the three Belgian studies (7,8,10) the frequency of chromosomal anomalies was lower (15.1, 13.3 and 17.6%) probably because of the institution's criteria for admission of patients (table 9). This high incidence of Down syndrome patients may be related to a precocious diagnosis which benefit an early guide to the institution. Yaqoob et al (2) reported a high incidence of Down syndrome (36%), which may be explained based on a high mean maternal age (37 years).

In 32 patients (12.30%) a Mendelian inheritance disorder was diagnosed. Thirteen were diagnosed as X-linked mental retardation. In 9 of them, Fragile X syndrome was confirmed. In the others the screening for fra (X) was negative. All presented a typical X-linked inheritance with other affected members in the family. A recent Brazilian

survey of 85 institutionalized individuals with severe MR, 38 males and 47 females for Fragile X syndrome no FRAXA mutations were found (16). One of the patients with agenesis of corpus callosum presented convulsive disorder and had two maternal uncles with seizures and mental retardation. In the majority of the Mendelian disorders diagnosed there is a high incidence of mental retardation. In achondroplasia the intelligence is usually normal. The patient diagnosed with achondroplasia had hydrocephalus which contributed to the mental retardation. In ectodermal dysplasia hypohidrotic the intelligence is also usually normal. Our patient had postnatal complications as well as fever and seizures.

The incidence of acquired condition was lower than in other studies, especially due to the category of CNS dysfunction caused by pre- or postnatal conditions other than infection. In contrast, 34.46% of the population could not be fit in any diagnosis. This is higher than the previous studies listed in table 9. Fryns et al. (10) observed 30.5% of non-classified patients. Schaap et al. (12) using the same methodology studied 116 moderated to severely retarded males from another Belgian institution and could not classify 50.9% of the patients.

Probably in the non-classified category there must be mentally retarded patients due to CNS dysfunction who could not be diagnosed. Four patients were twins and 11 had seizures suggesting some CNS dysfunction. Eleven patients had a family history of mental retardation suggesting a possible genetic etiology. Sequential

Table 9. Etiological classification in mentally retarded patients

	5	6	7	8	10	Present study
	n = 122	n = 146	n = 173	n = 158	n = 262	n = 260
1. Constitutional disorders	63	67.9	42.52	45.6	42	56.53
Chromosomal anomalies	36	32.9	15.03	13.3	17.6	34.23
Down syndrome	32	32.2	12.72	9.5	16.4	32.30
Others	4	0.7	2.31	3.8	1.2	3.84
Mendelian Disorder	5	14.4	19.64	22.8	21	12.30
MCA/MR syndrome	20	3	4.05	5.7	1.9	4.23
CNS malformation	2	7.6	3.8	3.8	1.5	3.84
2. CNS dysfunction	16	14.4	34.11	20.9	19	7.69
3. Pre- or postnatal infection	7	2.8	7.51	12.7	9.9	1.92
4. Postnatally acquired conditions	1	1.4	1.73	1.9	0	0.4
5. Psychosis	2	0	1.73	1.9	0	0
6. Non-classified	12	12.3	11.56	17.7	30.5	34.46

evaluation of the patients without diagnosis could allow a delineation of a definitive diagnosis offering appropriate prognostic and reproductive counseling to the families.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Nadia Ordovás and the social workers from APAE. The authors are also indebted to Dr. Mariluce Riegel and Dr. Albert Schinzel for performing the FISH analysis for Velo cardio facial and Williams syndrome and Dr. Greice Molfetta for performing molecular studies for Angelman syndrome.

References

1. Moser HW, Wolf PA. The nosology of mental retardation including the report of a survey of 1378 mentally retarded individuals at the Walter e Fernald State School. *Birth Defects* 1971;7:117-987.
2. Yaqoob M, Bashir A, Gustavson KH, Nazir R, Jalil F, Ferngren H. Severe mental retardation in 2 to 4 month-old children in Lahore, Pakistan: a prospective cohort study. *Acta Paediatr* 1995;84:267-72.
3. Stein ZA, Susser M. Mild mental subnormality: social and epidemiological studies. *Social Psychiatry Res Publ A.R.N.M.D.* 1969; XLVII: 62.
4. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. *Am J Med Genet* 1997;72:468-77.
5. Gustavson KH, Hagberg B, Hagberg G, Sars K. Severe mental retardation in a Swedish county. Epidemiology, gestational age, birth weight and associated CNS handicaps in children born 1959-70. *Acta Paediatr Scand* 1977;66:373.
6. Laxova R, Ridler MAC, Bowen-Bravery M. An etiological survey of the severely retarded Hertfordshire children who were born between January 1, 1965 and December 31, 1967. *Am J Med Genet* 1977;1:75-86.
7. Fryns JP, Kleczkowska A, Dereymaeker A,

- Hoefnagels M, Heremans G, Marien J, Van Den Berghe H. A genetic-diagnostic survey in an institutionalized population of 173 severely mentally retarded patients. *Clin Genet* 1986;30:315-23.
8. Dereymaeker, AM, Fryns JP, Haegeman J, Deroover J, Van Den Berghe H. A genetic-diagnostic survey in an institutionalized population of 158 mentally retarded patients. The Viaene experience. *Clin Genet* 1988;34:126-34.
 9. Schreppers-Tijdink GAJ, Curfs LMG, Wiegers A, Kleczkowska A, Fryns JP. A systematic cytogenetic study of a population of 1170 mentally retarded and/or behaviorally disturbed patients including Fragile X-screening. *J Génét Hum* 1988;36:425-46.
 10. Fryns JP, Volcke PH, Haspeslagh M, Beusen L, Van Der Berghe H. A genetic diagnostic survey in an institutionalized population of 262 moderately mentally retarded patients: the Borgerstein experience. *J Mental Def Res* 1990;34:29-40.
 11. Haspeslagh M, Fryns JP, Holvet M, Collen G, Dierck G, Baeke J, Van Den Berghe H. A clinical, cytogenetic and familial study of 307 mentally retarded, institutionalized, adult male patients with special interest for fra(X) negative X-linked mental retardation. *Clin Genet* 1991;39:434-41.
 12. Schaap C, Schrandt-Stumpel CTRM, Colla-Pijkels ETS, Van Driessche J, Kusters R, Fryns JP. A genetic diagnostic survey in an institutionalized population of 116 moderately to severely retarded male patients: the Rekem experience. *Genet Couns* 1995;6:251-8.
 13. Félix TM, Leite, JCL, Maluf SW, Coelho JC. A genetic diagnostic survey in a population of 202 mentally retarded institutionalized patients in the south of Brazil. *Clin Genet* 1998; 54:219-23.
 14. OMIM. On line Mendelian Inheritance in Man. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>
 15. Murphy CC, Yeargin-Allsopp M, Decouflé P, Drews CD. The administrative prevalence of mental retardation in 10-years-old children in Metropolitan Atlanta, 1985 through 1987. *Am J Publ Health* 1995;85:319-23.
 16. Mulatinho MV, Llerena JC, Pimentel MM. FRAXA screening in Brazilian institutionalized individuals with nonspecific severe mental retardation. *Genet Test* 2000;4:238-7.

Evaluation of genomic instability and cancer prevention

Sharbel W. Maluf¹, Mariluce Riegel¹, Silvio L.W. Almeida Jr¹,
Janaína P. Jaeger¹, Ana P.B. Souza¹, Valcinete F. Santana¹,
Luiza E. Dorfman¹, Gisele B. Trombetta¹,
Alexandre Bacelar², Bernardo Erdtmann³

OBJECTIVES: This study aimed at verifying the damage index acquired from the environment and from an inherited condition in the leukocytes of workers occupationally exposed to X-radiation and antineoplastic drugs, patients with Down syndrome, Fanconi anemia, and controls.

MATERIAL AND METHODS: Cytokinesis-block micronucleus assay (CB-MN) and single-cell-gel electrophoresis (SCGE) were employed in 22 workers potentially exposed to X-radiation and 22 controls matched for age, sex, and smoking habits from a hospital in southern Brazil. The same evaluation was employed in 12 individuals who had been occupationally exposed to antineoplastic drugs and in 14 patients with Fanconi anemia (FA), 30 with Down syndrome (DS), and 30 controls, in order to examine the sensitivity of the techniques to detect specific genome instability.

RESULTS: Both CB-MN and SCGE showed increased genetic damage in the cells of exposed individuals. In individuals handling antineoplastic drugs, no statistically difference was found when using CB-MN; however, the mean value of SCGE was significantly higher in exposed individuals when compared to controls. Down syndrome presented an increase just in the SCGE technique; the frequency of micronuclei and dicentric bridges was similar to that found in controls. Both CB-MN and SCGE showed increased genetic damage in the cells of individuals with Fanconi anemia. The high frequency of micronuclei seems to be due to clastogenic events, since the frequency of dicentric bridges was also elevated.

DISCUSSION: Both methods are efficient for monitoring mutagenic events in exposed populations or individuals presenting genetic instability. CB-MN represents a longer time of exposure, while SCGE detects momentary DNA damage and/or repair activity. The combination of both techniques is recommended to monitor chronically exposed populations. Changes in lifestyle may constitute an important way of preventing carcinogenesis, either in individuals presenting increased risk and in the general population.

Key-words: Antineoplastic agents; Down syndrome; Fanconi anemia; cytokinesis-block micronucleus assay; single-cell-gel electrophoresis.

Avaliação da instabilidade genômica e prevenção de câncer

OBJETIVOS: Este estudo teve como objetivo avaliar o nível de mutagênese em indivíduos normais não expostos, em trabalhadores expostos à radiação ionizante e drogas antineoplásicas e em indivíduos portadores de doenças genéticas, comparando os níveis de mutagênese herdada com aqueles adquiridos por exposição a mutágenos.

¹ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondence: Dr. Sharbel Maluf, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55-51-3316-8010; e-mail: sharbel@uol.com.br

² Medical Physics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

³ Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MÉTODOS: A técnica de micronúcleo em linfócitos do sangue periférico e a técnica do cometa ou eletroforese em célula única foram empregados em 22 trabalhadores potencialmente expostos à radiação X, 12 potencialmente expostos a drogas antineoplásicas, 34 controles adultos, 14 pacientes com anemia de Fanconi (AF), 30 com síndrome de Down (SD) e 30 controles infantis, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RESULTADOS: As duas técnicas mostraram um aumento no dano genético em células de indivíduos expostos a radiação-X. Nos indivíduos que manuseiam drogas antineoplásicas, não foi encontrada diferença significativa com a técnica de micronúcleo; no entanto, o índice de dano avaliado pela técnica do cometa foi significativamente maior em indivíduos expostos em relação a controles. Pacientes com síndrome de Down apresentaram um aumento no índice medido pela técnica do cometa; a frequência de micronúcleos e pontes dicêntricas foi semelhante ao valor encontrado em controles. Tanto a técnica de micronúcleo como a técnica do cometa mostraram aumento de dano genético nas células de indivíduos com anemia Fanconi. A alta frequência de micronúcleos parece ser devida a eventos clastogênicos, uma vez que a frequência de pontes dicêntricas também se encontrava elevada.

DISCUSSÃO: As duas técnicas são eficientes na monitoração de eventos mutagênicos em populações expostas ou em indivíduos que apresentam instabilidade genética. A técnica de micronúcleo representa um tempo maior de exposição, enquanto que a técnica do cometa detecta dano momentâneo ao DNA e/ou atividade de reparo. A combinação das duas técnicas é recomendada para monitorar populações cronicamente expostas. Mudanças no estilo de vida podem constituir uma forma importante de prevenir carcinogênese, tanto em indivíduos que apresentam risco aumentado como na população em geral.

Unitermos: Agentes antineoplásicos; síndrome de Down; anemia Fanconi; técnica de micronúcleo; técnica do cometa.

Revista HCPA 2001(3):276-285

Introduction

The mutagenic effect of ionizing radiation has been extensively studied (1-4), and an increase in chromosomal aberrations has been observed in occupationally exposed workers when the permissible levels of radiation are exceeded (5).

Antineoplastic drugs comprise chemicals that block the cellular growth, resulting in the death of dividing cells; as neoplastic cells are in active growing state, they preferentially die. Antineoplastic drugs include alkylants (e.g. cyclophosphamide), antimetabolic agents (e.g. fluorouracil), spindle poisons (e.g. vincristine), antibiotics (e.g. doxorubicin), and hormones (e.g. diethylstilbestrol). These drugs are in general teratogenic and are also frequently mutagenic. The mutagenic effects are mainly confirmed by chromosome mutation studies in patients submitted to acute or chronic treatment with antineoplastic drugs.

Among the individuals occupationally exposed to mutagenic and carcinogenic agents, the group handling antineoplastic drugs deserves special attention. Waksvik et al. (6) and Nikula et al. (7) reported a significant increase in structural chromosome aberrations in the lymphocytes of nurses handling antineoplastic drugs. An increased frequency of sister-chromatid exchange was also observed (8,9). Machado-Santelli et al. (10) observed an increased number of micronucleated exfoliated cells in the buccal cavity of nurses handling antineoplastic drugs. In other studies, no differences were observed between controls and workers exposed to antineoplastic drugs regarding the frequency of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations (11-14).

Individuals with Down syndrome (DS) or trisomy 21 are known to be at high risk for malignant diseases (15,16), and their cells are reported to exhibit increased sensitivity to various

mutagens, e.g. radiation (17-20), chemicals (21,22), and viruses (23).

Fanconi anemia (FA) is inherited as an autosomal recessive trait, and its outstanding clinical manifestations are generalized failure of the bone marrow leading to pancytopenia, major anatomical defects, especially of the radius, thumb, and kidney, mild mental and growth retardation, and patchy brown pigmentation of the skin (24,25). Elevated spontaneous chromosome breaks and rearrangements (26-28), in addition to mitotic disturbances, such as anaphase bridges, aberrant fragments, and micronuclei (29) are seen in almost all FA patients. The diagnosis can be made unequivocally by combining clinical data with cytogenetic evaluation of the frequency of aberrations induced by DNA cross-linking agents such as diepoxybutane or mitomycin C (27,30).

Micronuclei (MN) are expressed mutations and need cell division to appear. The concomitant analysis of dicentric bridges when determining micronucleus frequency does not involve much extra work, and may serve as a reference to the type of mechanism of mutagenesis (clastogenic or aneugenic). The damage detected by single-cell-gel electrophoresis (SCGE) assay (or comet assay) is repairable and does not need cell division; under alkaline conditions, it assesses double and single-strand breaks and alkali-labile sites. Although, in general, the comet assay may be considered as a more sensitive method to assess DNA damage, different mechanisms are involved when positive results appear in the MN test or the comet assay. Combination of the alkaline SCGE and the cytokinesis-block micronucleus assay (CB-MN) seems to be recommendable to assess genetic instability.

Materials and methods

The study was carried out at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a university hospital in the city of Porto Alegre, Brazil. The total sample consisted of 22 individuals who had been occupationally exposed to low levels of X-ray, 12 individuals who had been occupationally exposed to antineoplastic drugs, 34 nonexposed control individuals matched for age, sex, and smoking habits, 14 FA patients, 30 DS patients, and 30 infant control individuals. In X-ray-exposed individuals, exposure was measured by personal CaSO_4 thermoluminescent dosimeters. All

individuals answered the personal health questionnaire published by the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC) (31).

Peripheral blood samples were collected and directly used in the CB-MN and comet assays. For CB-MN, cytochalasin B (Cyt B, Sigma) was added to the lymphocyte culture at 44 h (4.5 mg/ml) (32,33). Cells were fixed in 3:1 methanol:acetic acid without hypotonic treatment, and the suspension was dropped onto clean slides and stained with Giemsa. Two thousand binucleated cells per individual were assessed for the presence of micronuclei and dicentric bridges (nucleoplasmic bridges between daughter nuclei) (34).

A standard protocol for the comet assay was applied according to Speit and Hartmann (35). The slides were prepared by mixing 5 ml of whole blood with 90 ml low melting point agarose (0.5%). Immediately after the addition of low melting point agarose to a microscope slide precoated with agarose, a coverslip was placed onto the slide, and the tray was kept in the refrigerator for 5 min until the agarose layer hardened. After that, the coverslip was gently removed, and the slide was lowered into cold, freshly made lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Na Sarcosinate, to which 1% Triton X-100 and 10% DMSO had been added). After at least 1 hour at 4 °C, the slides were gently removed from the lysing solution, and the excess liquid was blotted away on the back and edges. The slides were then placed at 4 °C on an horizontal gel box filled with fresh electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) until the liquid completely covered the slides, which were then left in the tray for 30 min before the power was turned on. Electrophoresis was carried out for 20 min at 25 V (0.9 V/cm), 300 mA. All the steps described above were carried out under red light to avoid the induction of DNA damage.

After electrophoresis, the slides were gently removed from the tank, and neutralizing buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) was added drop-wise to the slides three times at 5-min intervals. The slides were drained, and 70 ml ethidium bromide (40 mg/ml) was added. A coverslip was then placed onto the slide. The analysis was performed immediately after the staining. For evaluation of DNA damage, 50 cells per subject were analyzed at a magnification of 200 X under a fluorescent microscope (Zeiss), equipped with a 560 nm

excitation filter and a 590 nm barrier filter. The cells were visually classified into five categories, according to tail intensity, from undamaged (=0) to maximally damaged (=4) (36). Therefore, the total score for each subject (50 cells) could range from 0 (all undamaged) to 200 (all maximally damaged).

Statistical differences between controls and treated samples were determined with the non-parametric Mann-Whitney *U*-test. The Spearman test was used to analyze correlations.

Results

For the group exposed to X-radiation, both CB-MN ($P=0.008$) and alkaline SCGE ($P=0.001$) showed increased genetic damages in cells of exposed individuals. The frequency of dicentric bridges was analyzed and also showed a significant increase ($P = 0.016$). A statistically significant correlation was detected between age and genetic damage in both micronucleus frequency and comet values.

For the group of workers handling antineoplastic drugs, no statistical difference was found for micronucleus and dicentric bridge frequency between exposed individuals and controls ($P = 0.129$ and $P = 0.373$, respectively). However, the mean value of SCGE was significantly higher in the exposed group than in controls ($P = 0.0006$).

Finally, when CB-MN and SCGE were employed in leukocytes from 14 FA, 30 DS, and 30 control individuals, DS presented an increase just in the SCGE technique ($P < 0.001$); micronucleus and dicentric bridge frequencies were similar to those found in controls. Both CB-MN and SCGE techniques showed increased genetic damage in the cells of individuals with FA: all results were statistically significant, with $P < 0.001$.

The high frequency of micronuclei seems to be due to clastogenic events, since the frequency of dicentric bridges was also elevated. The micronucleus frequency was significantly correlated with dicentric bridges ($P < 0.001$) and with the damage index from comet assay ($P = 0.011$) (Spearman Correlation Test). The results of the comet and CB-MN assays in subjects occupationally exposed to X-radiation and antineoplastic drugs and in DS and FA patients are summarized in table 1.

Discussion

Increased frequencies of chromosome aberrations and micronuclei are well known among individuals occupationally exposed to ionizing radiation (5,37-39). Qualities of the radiation to which populations were exposed differed in most of the studies, and there was frequently more than one kind of radiation involved. Chromosome abnormalities have been described in populations exposed to low doses of radiation, and doses ranged from zero to 500 millisieverts (mSv) (37,40-42). In the present study, we investigated workers exposed only to X-radiation, and the accumulated dose range was from 0.2 to 121.8 mSv. We did not find any correlation between genetic effects and the doses recorded by the dosimeters. This result is in agreement with a previous study (42), in which 26 workers were studied and the accumulated dose ranged between 2.3 and 131.7 mSv.

The CB-MN assay has the advantage of detecting both acentric chromosome fragments due to DNA breakage during interphase and chromosome loss resulting from chromosome lagging during anaphase. Micronucleus formation can indicate damage caused by an exposure occurred long before blood was withdrawn for analysis. The concomitant analysis of dicentric bridges in the micronucleus test does not cause much extra work, and may serve as a reference to the type of mutagen (clastogenic or aneugenic). As expected, the significantly increased frequency of dicentric bridges in the present study suggests a clastogenic action in individuals exposed to X-radiation.

Under the alkaline conditions used here, the comet assay detected double and single-strand breaks, as well as alkali-labile sites. The increased comet values in the peripheral blood of radiological workers exposed to X-ray found in the present study indicate a higher level of radiation-induced primary DNA damage. Although the comet assay may be considered more sensitive for the assessment of induced DNA damage, the micronucleus test has the advantage of detecting the manifestation of damages, such as chromosomal aberrations. Some previous studies already comparatively investigated these two endpoints (43-45), but none of them was carried out *in vivo*. The high values of standard deviation found in the comet assay in the present

study elucidate the high interindividual variation of this technique (46,47). While the evaluation of micronuclei is limited to lymphocytes, the comet assay detects damage in all leukocytes that constitute a heterogeneous mixture of cells. Lifespan of subpopulations may vary from weeks to decades (lymphocytes), while other cells have a short half-life ranging from 7 to 24 hours (granulocytes) (47).

In the case of chronic exposure, comparing the levels of damage revealed in a cytogenetic technique with those found in the comet assay may provide information about concurrent *versus* past exposure levels. The micronucleus frequency represents a longer time of exposure with a cumulative effect, while the comet assay detects momentary DNA damage and/or repair activity. In the present study, blood samples were collected during the work interval, and the comet assay effects on exposed individuals might reflect concurrent exposure.

Antineoplastic drugs include unrelated chemical agents that can inhibit tumor growth; the most commonly used include clastogenic and aneugenic drugs. The group exposed to antineoplastic drugs presented a frequency of micronuclei and dicentric bridges similar to the control group. However, when SCGE was applied to the same blood samples, increased values were detected in exposed individuals. SCGE does not require cell division. This damage may have originated minutes or hours before the blood was withdrawn for analysis. Repair of this damage is cell-type dependent.

Workers handling antineoplastic drugs can be exposed through inhalation of aerosolized drugs, transdermal absorption, and accidental ingestion. Increased genetic damage in workers occupationally exposed to antineoplastic drugs has been related with careless handling of these substances (10,48-51). In the present study, pharmacists and nurses have used safety covers and have followed strict guidelines to work with antineoplastic drugs.

Smoking was not a frequent habit in our subjects. This fact could explain that there was no correlation between smoking habit and detection of genetic effects. The increase in micronucleus frequency in relation to age in the present study is in agreement with other studies (33,52,53). A significant increase in the comet values in relation to age was also found. This result

is in disagreement with some studies using comet assays to monitor human populations (54,55). However, Singh et al. (56) reported an age-related increase in the levels of DNA damage in lymphocytes of the blood of non-smoking subjects, using a procedure with increased sensitivity of the pH>13 assay by increasing the duration of electrophoresis from 20 to 40 minutes. When the exposed and control groups were tested separately, the unexposed individuals did not show a correlation with age. When the cytogenetic endpoints were compared with years of employment, no correlation was found. These results may indicate a greater sensitivity to X-radiation in older individuals.

DS is considered a premature aging syndrome, and it has been compared with other disorders like Werner syndrome, Cockaine syndrome, and ataxia-telangiectasia. Children with DS are generally known to present a higher risk for developing leukemia. It could be shown that by triplication of a special fragment of chromosome 21, the dosage of Cu/Zn superoxide dismutase is elevated, resulting in a disturbance of the very sensitive balance of enzymes responsible for oxygen radical metabolism (20,57). Radicals damage the DNA and gradually exhaust the repair capacity of cells, with consequent chromosome breaks and micronucleus accumulation; this causes mitosis impairment and delay in the cell cycle. Thus, similarly to other diseases with completely different genetic backgrounds, via the impairment of DNA repair, DS leads to the common symptoms of premature senescence. At the chromosomal level, sensitivity of cells of DS patients to X-ray exposure is elevated in relation to cells of normal controls, although the ratio of sensitivity found in each study varies (17-20).

The results of the analysis of micronuclei and dicentric bridges in individuals with DS was similar to controls. Weirich-Schwaiger et al. (58), in a study of senescence and DNA repair, demonstrated that in young individuals with DS, the spontaneous micronucleus frequency was similar to young controls, but they observed a striking increase of micronucleus frequency at the final stages of cells growing in vitro. In contrast, the number of chromosome breaks did not follow this increase, which shows a possible age-related susceptibility to aneuploidy in these cells. The sensitivity ratio, measured by chromosome aberrations, has been

Table 1. Mean frequencies of micronuclei (MN), dicentric bridges (DB), and comet assay damage scores (SCGE) in groups exposed to X-ray and antineoplastic drugs, Down syndrome and Fanconi anemia patients, and controls

Group	n	Mean age	MN ²	DB ²	SCGE ¹
Exposed to X-radiation	22	37.18	17.68±4.69	5.95±3.14	17.73±10.51
Controls	22	32.5	14.36±5.18	3.91±2.07	8.54±7.11
Exposed to antineoplastic drugs	12	34.75	13.50±6.05	2.83±1.85	20.83±10.19
Controls	12	34.42	11.08±5.96	2.75±2.67	8.08±5.16
Down syndrome	30	0.72±1.80	10.17±3.64	2.77±1.65	13.4±8.21
Fanconi anemia	14	9.74±6.10	21.71±3.38	7.57±1.70	26.50±22.38
Controls	30	3.54±4.86	9.30±4.47	2.73±1.31	8.67±11.65

¹ DS was calculated by adding the score (0 to 4) of each of the 50 cells analyzed (maximum per individual: 0; minimum: 200).

² In 2000 binucleated cells.

suggested to decrease with age (59). Such behavior is important to consider, because in the present study, the sample was formed by very young individuals (mean age = 0.72±1.80), and the DNA damage index found in the comet assay was higher when compared to controls.

FA is characterized as a DNA repair disorder, since cells derived from patients are hypersensitive to DNA cross-linking agents. Although the primary defects in FA patients are not known, biochemical evidence supports either a direct defect in the removal of DNA cross-links or a defect in the ability of cells to respond to oxidative stress, as a result from the interaction with cross-linking agents. The localization of chromosome aberrations in FA shows a non-random pattern in the breakpoints correlated with the chromosomal location of fragile sites, oncogenes, and points involved in cancer-rearrangements, suggesting a possible relationship with the high predisposition to cancer observed in this disease (60,61).

Fenech et al. (1) have evaluated the performance of the CB-MN assay as an in vivo dosimeter in a study with cancer patients undergoing fractionated partial body radiotherapy obtaining a dose-related increase in MN in all the patients studied. The high frequency of micronuclei seems to be due to clastogenic events, since the frequency of dicentric bridges was also elevated in the same order of the

micronuclei (>2x). FA patients also presented a proportionally higher DNA damage index in SCGE than in the CB-MN assay.

In short, our study demonstrates the presence of genotoxic effects in workers exposed to X-irradiation with two independent genetic endpoints and indicates that the combination of the comet assay with the micronucleus test may be useful for the monitoring of populations chronically exposed to genotoxic agents. Avoidance of environmental stress on genetically predisposed patients may finally result in an increase in individual life expectancy.

Genetic damage, inheritance and environment

The different characteristics between the micronucleus test and the comet assay show the importance of this concomitant analysis both for quantitative studies and for understanding the mechanisms that form the alterations and action of DNA repair. Workers exposed to mutagenic agents have an inherited capacity to repair DNA damage; this capacity is polymorphic and makes individuals more or less sensitive to exposure to mutagenic agents. Individuals carrying unfavorable genetic heritage concerning the maintenance of genomic stability may have a high frequency of genetic alterations even if they are apparently not exposed to mutagenic agents or if they are exposed only to

agents commonly present in the environment. The two assays used in this study provided information regarding the number and type of alterations found in these two groups of individuals.

Daily use of antimutagens and anticarcinogens will probably be the most effective procedure to prevent cancer. There are several ways of preventing or reducing mutagenesis. Chemical agents that act in the repair of DNA damage or in the metabolism of mutagenic agents may be effective. Several examples illustrate that antimutagenic effects are often specific for certain types of mutagens and/or tests. This way, if antimutagens have an impact on human diseases, it is essential that they be specifically directed against the most common mutagens found in the environment, according to the habits and activities of each one of them (62).

Carcinogenesis is related to genetic changes in somatic cells produced by mutagens and carcinogens. The molecular mechanisms of human carcinogenesis are very complex, involving multiple genetic changes in established cell lineages; these alterations are usually more numerous in cells of more malignant tumors. The carcinogenic process requires a long time to be completed, and precancerous changes may persist for many years. Recent findings on the complex alterations observed in human cancer, the presence of new genotoxic substances in our daily life, new promoters of cancer, and new precancerous changes are important advances that serve as basic information to consider ways of preventing cancer and developing recommendations for the improvement of life quality (63).

A lot of attention has been given to studies that suggest the involvement of active oxygen and free radicals in an array of pathological events, cancer, and some aging processes. Oxygen is indispensable for aerobic organisms; however, it is also believed to be responsible for undesirable effects. Species of oxygen such as hydrogen peroxide, superoxide radical, simple oxygen, and other radicals are considered agents that attack polyunsaturated fatty acids in the cellular membrane, leading to a lipid peroxidation. Several studies have suggested that lipid peroxidation may result in destabilization and disintegration of the cellular membrane, leading to problems in the liver, some diseases, aging, and susceptibility to cancer (64).

Lipid peroxidation is a problem related not only to the food-processing industry, but also to the

human body itself. However, in living systems, certain enzymes and endogenous antioxidants are used to inhibit peroxidation processes by removing active oxygen, reducing peroxides, and capturing radicals. There are also several compounds in nature that act as antioxidants, and are believed to inhibit carcinogenesis and delay aging (65).

A great number of metabolites extracted from vegetables and used in our diet were tested in terms of their antimutagenic capacity. In microbial tests, several of them showed to inhibit the mutagenic effect of toxic elements (66).

Vitamin C, at a given concentration, diminishes the frequency of sister-chromatid exchange in lymphocytes of the human peripheral blood. The effect of vitamin C as an inhibitor of mutagenicity for various carcinogens is attributed to its antioxidant action. Some studies have also emphasized the anticarcinogenic effect of vitamin C, which is an effective protector against the carcinogenic activity of ionizing radiation and chemical agents. Vitamin C is the most effective agent in the inhibition of mutations induced by ethylmethanesulfonate (EMS). In the presence of vitamin C at a concentration of 100 mg/ml, EMS-induced mutations were reduced to almost one-fourth of the frequency found in control cultures treated only with EMS (67).

Fiber-rich diets may protect the organism against some types of carcinogenic agents through their absorption; this way, these agents are expelled from the digestive tract. A group of mutagens identified in roast beef, fish, chicken, and grain products (68,69) may have their effects neutralized in the presence of a fiber-rich diet (62).

The levels of most environmental carcinogens, including heterocyclic amines formed in the preparation of some food items, are much below the minimum level necessary to induce cancer in laboratory animals. However, cancer development is the final result of multiple sequential genetic transformations. There is still much to be understood about cancer prevention, but interesting results have been observed as a result of changes in lifestyle. It should be noted that some types of cancer have disappeared. Cases of cancer in X-ray workers caused by exposure to ionizing radiation are also extremely rare (63). Some changes in the lifestyle of people daily exposed to mutagens should be adopted. The following measures should be observed in order to prevent cancer:

1. Follow a balanced diet, avoiding excess of calories and fat.
2. Avoid excessive consumption of alcohol.
3. If you are a smoker, smoke as little as possible, or try to stop smoking.
4. Avoid excessive exposure to sunlight.
5. Do moderate physical exercises regularly.

References

1. Fenech M, Denham J, Francis W, Morley AA. Micronuclei in cytokinesis blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 1990;57:373-83.
2. Balasem AN, Ali ASK. Establishment of dose-response relationships between doses of Cs137 gamma-rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 1991;259:133-8.
3. Eraxon GL, Kligerman AD, Bryant MF, Sontag MR, Halperin EC. Induction of micronuclei by X-radiation in human, mouse and rat peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res* 1991;253:193-8.
4. He JL, Chen WL, Jin LF, Jin HY. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutat Res* 2000;469:223-31.
5. Jha AN, Sharma T. Enhanced frequency of chromosome aberrations in workers occupationally exposed to diagnostic X-rays. *Mutat Res* 1991;260:343-8.
6. Waksvik H, Klepp O, Brogger A. Chromosome analyses of nurses handling cytostatic agents. *Cancer Treat Rep* 1981;65:607-10.
7. Nikula EK, Kiviniitty J, Leisti J, Taskinen PJ. Chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *Scand J Work Environ Health* 1984;10:71-4.
8. Norppa H, Sorsa M, Vainio H, Grohn P, Heinonem E, Holsti L, et al. Increased sister-chromatid exchange frequencies in lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *Scand J Work Environ Health* 1980;67:229-301.
9. Goloni-Bertollo EM, Tajara E, Manzato AJ, Varella-Garcia M. Sister-chromatid exchange and chromosome aberration in lymphocytes of nurses handling antineoplastic drugs. *Int J Cancer* 1992;50:341-4.
10. Machado-Santelli GM, Cerqueira EM, Oliveira CT, Pereira CAAB. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutat Res* 1994;322:203-8.
11. Kolmodin-Hedman B, Hartvig P, Sorsa M, Falk K. Occupational handling of cytostatic drugs. *Arch Toxicol* 1983;54:25-33.
12. Stiller A, Obe G, Boll I, Pribilla W. No elevation of the frequencies of chromosome alterations as a consequence of handling cytostatic drugs. Analysis with peripheral blood and urine of hospital personnel. *Mutat Res* 1983;121:253-9.
13. Barale R, Sozzi G, Toniolo P, Borghi O, Reali D, Loprieno N, et al. Sister-chromatid exchange in lymphocytes and mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. *Mutat Res* 1985;157:235-40.
14. Benhamou S, Pot-Deprun J, Sancho-Garnier H, Chouroun-Liskov I. Sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in lymphocytes of nurses handling cytostatic agents. *Int J Cancer* 1988;41:350-3.
15. Robinson LL, Nesbit ME, Sather HN, Level C, Shahidi N, Kennedy A, et al. Down syndrome and acute leukemia in children: a 10-year retrospective survey from Children's Cancer Study Group. *J Pediatr* 1984;105:235-42.
16. Heidemann A, Schmalenberger B, Zankl H. Sister-chromatid exchange frequency and lymphocyte proliferation in a Down's syndrome mosaik developing an acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;15:109-12.
17. Higurashi M, Conen PE. In vivo chromosomal radiosensitivity in 'chromosomal breakage syndromes'. *Cancer* 1973;32:380-3.
18. Karlinsky H. Alzheimer's disease in Down's syndrome: a review. *J Am Geriatr Soc* 1986;34:728-34.
19. Oliver C, Holland A. Down's syndrome and Alzheimer's disease: a review. *Psychol Med* 1986;16:307-22.
20. Schweiger H, Weirich HG, Brunner P, Rass C, Hirsch-Kauffmann M, Groner Y, et al. Radiation sensitivity of Down's syndrome fibroblasts might be due to overexpressed Cu/Zn-superoxide dismutase (EC 1.15.1.1). *Eur J Cell Biol* 1989;48:79-87.
21. Iijima K, Morimoto K, Koizumi A, Higurashi M, Hirayama M. Bleomycin-induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in Down syndrome lymphocyte cultures. *Hum Genet* 1984;66:57-61.
22. Shubber EK, Hamami HA, Allak BMA, Khaleel AH. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes from infants with Down's syndrome. *Mutat Res* 1991;248:61-72.
23. Higurashi M, Tada A, Mirayama S, Hirayama M, Hoshina H, Tamura T. Chromosome damage in Down syndrome induced by chicken pox infection. *Pediatr Res* 1976;10:189-92.
24. Sandberg AA. Chromosome breakage syndromes.

- In: The chromosomes in human cancer and leukemia. New York: Elsevier; 1980. p.152-70.
25. Strathdee CA, Buchwald M. Molecular and cellular biology of Fanconi anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992;14:177-85.
 26. Schroeder TM. Genetically determined chromosome instability syndromes. *Cytogenet Cell Genet* 1982;33:119-32.
 27. Auerbach AD, Rogatko A, Schroeder-Kurth TM. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* 1989;73:391-6.
 28. Sakamoto Hojo ET, van Diemen PCM, Darroudi F, Natarajan AT. Spontaneous chromosomal aberrations in Fanconi anaemia, ataxia telangiectasia fibroblasts and Bloom's syndrome lymphoblastoid cell lines as detected by conventional cytogenetic analysis and fluorescence in situ hybridisation (FISH) technique. *Mutat Res* 1995;334:59-69.
 29. Schroeder TM. Cytogenetische und cytologische Befunde bei enzymopenischen Panmyelopathien und Pancytopenien. *Humangenetik* 1966;1:194-6.
 30. Auerbach AD, Wolman SR. Susceptibility of Fanconi's anemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens. *Nature* 1976;261:494-6.
 31. Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. ICPEMC publication 14. *Mutat Res* 1988;204:379-406.
 32. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985;147:29-36.
 33. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993;285:35-44.
 34. Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* 1997;392:11-8.
 35. Speit G, Hartmann A. The comet assay (single cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 1999;113:203-12.
 36. Maluf SW, Erdtmann B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronucleus analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 2000;471:21-7.
 37. Evans HJ, Buckton KE, Hamilton GE, Carothers A. Radiation-induced chromosome aberrations in nuclear-dockyard workers. *Nature* 1979;277:531-4.
 38. Thierens H, Vral A, De Ridder L. A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. *Mutat Res* 1996;360:75-82.
 39. Vera GV, Aleksandra F, Dragan K, Andrija H. Assessment of genome damage in occupational exposure to ionizing radiation and ultrasound. *Mutat Res* 1997;395:101-5.
 40. Lloyd DC, Purrot RJ, Reeder EJ. The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutat Res* 1980;72:523-32.
 41. Bauchinger M, Eckerl H, Drexler G, Streng S, Schmid E. Chromosome dosimetry and occupational radiation exposure. *Radiation Protection Dosimetry* 1984;2:93-7.
 42. Barquinero JF, Barrios L, Caballín MR, Miró R, Ribas M, Subias A, et al. Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res* 1993;286:275-9.
 43. Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, Kirsh-Volders M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 1996;11:485-92.
 44. Fuscoe JC, Afshari AJ, George MH, DeAngelo AB, Tice RR, Salman T, et al. In vivo genotoxicity of dichloroacetic acid: evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay. *Environ Mol Mutagen* 1996;27:1-9.
 45. Goethem FV, Lison D, Kirsh-Volders M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat Res* 1997;392:31-43.
 46. DeMéo M, Laget M, Castegnaro M, Dumenil G. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. *Mutat Res* 1991;260:295-306.
 47. Tice RT. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venitt S, editors. *Environmental mutagenesis*. Oxford: Bios Scientific Publishers; 1995.
 48. Maluf SW, Erdtmann B. Evaluation of the occupational genotoxic risk in a Brazilian hospital. *Genet Mol Biol* 2000;23:485-488.
 49. Grummt T, Grummt HJ, Schott M. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of nurses and physicians handling antineoplastic drugs. *Mutat Res* 1993;302:19-24.
 50. Sorsa M, Anderson D. Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. *Mutat Res* 1996;355:253-61.

51. Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2000;463:13-31.
52. Migliore L, Parrini M, Sbrana I, Biagini C, Battaglia A, Loprieno N. Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect. *Mutat Res* 1991;256:13-9.
53. Köteles GJ, Bojtor I, Szirmani S, Bérces J, Ótos M. Micronucleous frequency in cultured lymphocytes of an urban population. *Mutat Res* 1993;319:267-71.
54. Betti C, Davini T, Gianessi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 1994;307:323-33.
55. Frenzili G, Betti C, Davini T, Desideri M, Fornai E, Gianessi L, et al. Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 1997;375:117-23.
56. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JD, Brant LJ, Morrel CH, et al. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res* 1991;248:285-9.
57. Ceballos I, Nicole A, Briant P, Grimber G, Delacourt A, Flament S, et al. Expression of human CuZn superoxide dismutase gene in transgenic mice: model for gene dosage effect in Down's syndrome. *Free Radic Res Commun* 1991;12-13:581-9.
58. Weirich-Schwaiger H, Weirich HG, Gruber B, Schwaiger M, Hirsch-Kauffmann M. Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes. *Mutat Res* 1994;316:37-48.
59. Takeshita T, Shibusawa AC, Shimizu K, Hoshino H, Yamagata Z, Iijima S, et al. The effect of aging on cell-cycle kinetics and X-ray-induced chromosome aberrations in cultured lymphocytes from patients with Down syndrome. *Mutat Res* 1992;275:21-9.
60. Porfirio B, Smeets D, Beckers L, Caporossi D, Tedeschi B, Vernole P, et al. Fragile sites and chromosome instability: the distribution of breaks induced by cis-diamine-dichloro-platinum (II) in Fanconi anemia lymphocytes cultures. *Hum Genet* 1991;86:256-60.
61. Fundia A, Gorla N, Larripa I. Spontaneous chromosome aberrations in Fanconi's anemia patients are located at fragile sites and acute myeloid leukemia breakpoints. *Hereditas* 1994;120:47-50.
62. Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat Res* 1994;307:395-410.
63. Sugimura T. Cancer prevention: underlying principles and practical proposals. In: Kuroda Y, Shankel DM, Waters MD, editors. *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II*. New York and London: Plenum Press; 1990. p.23-34.
64. Osawa T, Namiki M, Kawakishi S. Role of dietary antioxidants in protection against oxidative damage. In: Kuroda Y, Shankel DM, Waters MD, editors. *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II*. New York and London: Plenum Press; 1990. p.139-53.
65. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 1983;221:1256-64.
66. Wall ME, Wani MC, Hughes TJ, Taylor H. Plant antimutagens. In: Kuroda Y, Shankel DM, Waters MD, editors. *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II*. New York and London: Plenum Press; 1990. p.61-78.
67. Kuroda Y. Antimutagenic activity of vitamins in cultured mammalian cells. In: Kuroda Y, Shankel DM, Waters MD, editors. *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II*. New York and London: Plenum Press; 1990. p.233-56.
68. Wakabayashi K, Nagao M, Esumi H, Sugimura T. Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res* 1992;52:2092s-8s.
69. Overik E, Gustafsson J. Cooked-food mutagens: current knowledge of formation and biological significance. *Mutagenesis* 1990;5:437-46.

Selective screening of 18,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism

Janice C. Coelho^{1,2}, Maira G. Burin², Moacir Wajner^{1,2},
Carmem R. Vargas², Fernanda T. S. Souza^{1,2}, Roberto Giugliani^{2,3}

OBJECTIVE: The number of diagnosed inborn errors of metabolism (IEM) is growing constantly due to the improvement and widespread availability of analytical techniques. In 1982, a laboratory for the detection of IEM was set up in Porto Alegre, Brazil, and became a national reference centre for the diagnosis of these disorders. The aim of this study is to report the most frequent IEM diagnosed in our country.

MATERIAL AND METHODS: Eighteen thousand patients with signs and symptoms suggestive of IEM were investigated in our laboratory from 1982 to 2000 using specific protocols which included tests for the detection of glucosaminoglycans (GAGS), amino acids, sugars, oligosaccharides, sialyloligosaccharides, organic acids, as well as various metabolites.

RESULTS: The biochemical investigation was completed in 17,822 patients and an IEM was detected in 1,460 cases (8.5%). Groups of IEM of higher incidence in our sample were lysosomal storage disorders (59.4%) and aminoacidopathies (18.8%). The disorders most frequently diagnosed were Gaucher disease, GM1 gangliosidosis, mucopolysaccharidosis type I, classical phenylketonuria, mucopolysaccharidosis type VI and mucopolysaccharidosis type II.

CONCLUSIONS: This study shows that the establishment of reference centres for the investigation of rare genetic diseases is a suitable approach to the study of IEM in developing countries such as Brazil.

Key-words: Inborn errors of metabolism; selective screening; biochemical genetics.

Investigação seletiva de 18 mil pacientes brasileiros de alto risco para a detecção de erros inatos do metabolismo

OBJETIVOS: O número de erros inatos do metabolismo (EIM) diagnosticados está crescendo constantemente devido ao aperfeiçoamento e disponibilidade das técnicas laboratoriais. Em 1982, foi estabelecido em Porto Alegre, Brasil, um laboratório para a detecção de EIM e este tornou-se um centro de referência nacional para o diagnóstico destes distúrbios. O objetivo deste trabalho é registrar os EIM mais freqüentes diagnosticados em nosso país.

MATERIAL E MÉTODOS: Dezoito mil pacientes apresentando sinais e/ou sintomas sugestivos de um EIM foram investigados em nosso laboratório de 1982 a 2000, utilizando-se protocolos específicos que incluíam testes para a detecção de glicosaminoglicanos (GAGS), aminoácidos, açúcares, oligossacarídeos, sialiloligosacarídeos, ácidos orgânicos e outros metabólitos.

RESULTADO: Dezesete mil oitocentos e vinte e dois pacientes completaram a investigação bioquímica e em 1.460 casos (8,5%) foi detectado um EIM. Os grupos de EIM de maior

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

³ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

freqüência em nossa amostra foram as doenças lisossômicas de depósito (59,4%) e as aminoacidopatias (18,8%). Os distúrbios mais freqüentes foram a doença de Gaucher, a gangliosidose GM1, a mucopolissacaridose tipo I, a fenilcetonúria clássica, a mucopolissacaridose tipo VI e a mucopolissacaridose tipo II.

CONCLUSÕES: Esse estudo mostrou que o estabelecimento de centros de referência para a investigação de doenças genéticas raras é adequado para o estudo de EIM em países em desenvolvimento como o Brasil.

Unitermos: Erros inatos do metabolismo; investigação seletiva; genética bioquímica.

Revista HCPA 2001(3):286-293

Introduction

Specific protocols for selective screening of inborn errors of metabolism (IEM) in high-risk patients have been introduced since 1950 in several countries. In the initial surveys, the techniques employed were simple and could only detect a few diseases. A constant improvement of analytical equipment and techniques for assaying metabolites has allowed the diagnosis of an increasing number of disorders. A further improvement in the detection of these diseases has been achieved by the introduction of more elaborate procedures such as tissue culture, specific enzyme assays and molecular analyses (1).

The establishment of an accurate diagnosis is necessary for the introduction of supportive and/or specific therapeutic measures. When a successful treatment is not available, genetic counseling and prenatal diagnosis can be offered in order to prevent new cases in the index family. Therefore, selective screening for inherited metabolic diseases represents a major challenge to modern preventive medicine (1). Reference centres for selective screening were set up in developed countries and, in most cases, became specialized in the detection of specific groups (such as aminoacidopathies, organic acidaemias, lysosomal storage disorders (LSD), peroxisomal disorders, etc.) or even for the diagnoses of a single disease. Based on the experience of developed countries, a reference laboratory for the detection and diagnosis of IEM was set up in Porto Alegre, Southern Brazil. The laboratory is part of a University Hospital and has been receiving biological samples from patients at risk for IEM from all over Brazil since 1982.

We present here the results obtained from

analysis of samples from 18,000 high-risk patients referred to our centre from January 1982 to December 2000. In addition, we discuss the role of a reference laboratory for IEM in developing countries.

Material and methods

The patients studied were referred for investigation by several services from different regions of Brazil and from other countries in Latin America.

Urine and plasma samples were obtained from 18,000 patients with signs and/or symptoms suggestive of a metabolic disorder and at first they were submitted to the "basic" protocol. The tests included in this protocol (table 1) comprise qualitative screening tests of urine and amino acid paper chromatography of plasma and urine (2,3). Further investigations were carried out in the case of a positive or doubtful result in any of these tests, or when the specific metabolic disorder suspected was not investigated by tests included in this "basic" protocol. In these cases, additional biological samples were requested, such as white blood cells (WBC), cerebrospinal fluid (CSF) and/or skin biopsy, and analyzed by selected specific assays of the "extended" protocol (table 2). In addition, specific enzyme assays on leukocytes, erythrocytes, skin fibroblasts or liver biopsy were performed for confirmation of a diagnosis (table 3). Occasionally, samples were sent to reference laboratories in other countries if complementary analyses became essential.

Results

Table 4 summarizes the diagnoses performed in the current study. The results were

Table 1. Qualitative tests included in the “basic” protocol

Qualitative tests	Sample	Metabolites Detected
Benedict	Urine	Reducing substances
Ferric chloride	Urine	Aromatic hydroxyl groups
Nitrosonaphthol	Urine	Tyrosine and its metabolites
p-Nitroaniline	Urine	Methylmalonic and ethylmalonic acids
Cyanide-nitroprusside	Urine	Cystine and homocystine
CTMA bromide	Urine	Glycosaminoglycans
Dinitrophenylhydrazine	Urine	Keto acids
Paper chromatography	Urine/plasma	Amino acids
Sulfite test	Urine	Deficiency of molibdenium cofactor

Table 2. Tests included in the “extended” protocol

Test	Detection of	Sample
Toluidine blue spot test	Glycosaminoglycans	Urine
Thin-layer chromatography	Oligosaccharides	Urine
	Glycosaminoglycans	Urine
	Sialyloligosaccharides	Urine
	Carbohydrates	Urine
High performance liquid chromatography	Amino acids	Plasma, Urine, CSF
Gas chromatography	Organic acids	Urine
Quantitative assays	Orotic acid	Urine
	Sialic acid	Urine
	Glycogen	WBC
	Succinylacetone	Plasma
	Thiosulphate	Urine
Filipin staining test for Niemann-Pick C disease	Cholesterol Storage	Skin fibroblasts

obtained by the evaluation of 17,822 patients who completed the investigation. The study confirmed the presence of 80 different metabolic disorders in 1,460 patients, corresponding to a frequency of 8.19%. These diagnoses were distributed among the various groups of disorders, more than half of them being represented by the LSD group (59.4%). Other groups included

aminoacidopathies (18.8%), organic acidaemias (6.9%) and disorders of carbohydrate metabolism (5.3%). Among the disorders most frequently diagnosed were Gaucher disease (13.5%), GM1 gangliosidosis (7.05%), mucopolysaccharidosis type I (5.5%), classical phenylketonuria (PKU) (5.5%), mucopolysaccharidosis type VI (4.4%) and mucopolysaccharidosis type II (4.3%).

Table 3. Specific enzymatic assays performed in this study in selected cases

Enzyme	Sample	Disease
α -Fucosidase	L, F	Fucosidosis
α -Galactosidase	P	Fabry disease
α -Glucosidase	L, F	Pompe disease
α -Iduronidase	P	Mucopolysaccharidosis I
α -Mannosidase	L, F	α -Mannosidosis
Acetyl-CoA glucosaminide N		
-acetyltransferase	L, F	Mucopolysaccharidosis IIIC
Arylsulphatase A	L, F	Metachromatic leukodystrophy, MSD
Arylsulphatase B	L, F	Mucopolysaccharidosis VI, MSD
Arylsulphatase C	F	X-linked ichthyosis, MSD
β -Galactosidase	L, F	GM1 gangliosidosis, Mucopolysaccharidosis IVB
β -Glucosidase	L, F	Gaucher disease
β -Glucuronidase	P, L	Mucopolysaccharidosis VII, Mucopolipidosis
β -Mannosidase	L, F	β -Mannosidosis
Biotinidase	P	Biotinidase deficiency
Ceruloplasmin	P	Wilson disease, Menkes disease
Fructose-1,6-diphosphatase	LB	Fructose-1,6-diphosphatase deficiency
Galactosylceramidase	L, F	Krabbe disease
Galactose-1-P-uridylyltransferase	E	Classical Galactosaemia
Galactose-6-sulphatase	L, F	Mucopolysaccharidosis IVA, MSD
Glucose-6-phosphatase	LB	Glycogenosis type I
Heparan sulphamidase	F	Mucopolysaccharidosis IIIA
Hexosaminidases	P, L, F	Tay-Sachs disease, Sandhoff disease, Mucopolipidosis
Iduronate sulphatase	P	Mucopolysaccharidosis II, MSD
N-acetylgalactosaminidase	P	Schindler disease
N-acetylglucosam-6-sulphatase	L, F	Mucopolysaccharidosis IIID
N-acetylglucosaminidase	P	Mucopolysaccharidosis IIIB
Neuraminidase	F	Sialidosis
Sphingomyelinase	L, F	Niemann-Pick disease types A and B

(P plasma, L leucocytes, F skin fibroblasts, E erythrocytes, LB liver biopsy, MSD multiple sulphatase deficiency)

Discussion

The estimated frequency of IEM in high-risk patients established in this study was 8.19%. This value is higher than the value established in a previous study of our group developed in 1997 with 10.000 patients (4). Another study reported by Wannmacher et al. (5), which analyzed a population from the same region of Brazil, estimated this frequency as being 5.9%. In addition, a study carried out by Chamoles et al. (6) in Argentina found a frequency of IEM of 6.25% among 14,928 high-risk patients carrying a metabolic abnormality. We attribute the difference among these frequencies to high specialization of our laboratory in these last years. At this time, we are capable of diagnosing a large group of metabolic diseases and we have been in contact with several centres in Europe and USA that help us when necessary.

In a previous study by our group (4,7), GM1 gangliosidosis was the disease with the highest incidence in our population. In the present investigation, Gaucher disease and GM1 gangliosidosis are the most frequent IEM diagnosed. The increase in the diagnosis of Gaucher disease is due to a specific program of detection of this disease developed by our group in the last two years, since this disease has an efficient treatment with enzymatic reposition therapy. GM1 gangliosidosis also has a high prevalence in our region what is in accordance with the data of Severini et al. (8).

The mucopolysaccharidosis (MPS) type I and VI are the most frequent MPS found in the present study and MPS II appear in third position. The increase in the MPS II frequency is due to the improvement of its laboratory diagnosis, i. e., the analysis of the iduronate sulphatase activity, the enzyme deficient in this condition.

PKU has also been increasingly diagnosed in our laboratory, probably as the result of an increase in the proportion of newborns being referred to us because of the mass neonatal screening for PKU in our country. The same fact has been also observed in other Latin American countries like Chile and Mexico (9,10).

LSD were detected in 59.4% of our sample, representing the most frequent IEM group. Similar results have also been observed in Colombia, where this group of diseases, mainly represented by mucopolysaccharidosis, is more frequently

reported (11). On the other hand, in a different survey conducted by Velázquez et al. (12), using the questionnaire of the Metabolic Information Network (MIN), LSD and amino acid disorders were found to be the most frequent disorders in Latin America. The questionnaires used in this survey were completed by physicians from different Latin America countries (Argentina, Brazil, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Mexico and Venezuela).

We should emphasize that our laboratory was the first to offer specific diagnosis of LSD in Brazil and soon became recognized as a specialized centre for these disorders, and this has probably contributed to the high frequency of the diseases found in the present study. Moreover, storage disorders are more "evident" to the clinician since they usually cause "syndromic" (coarse) facies, hepato and/or splenomegaly, macrocephaly or other signs that call the attention of clinicians.

Other studies on the prevalence of IEM in European populations revealed that aminoacidopathies and organic acidaemias are the most frequent disorders among the IEM (1). Since we have set up high-performance liquid chromatography and ion-exchange chromatography for aminoacid quantification and gas chromatography for organic acid detection, the number of aminoacidopathies and especially organic acid disorders identified has grown steadily.

Specifically regarding organic acidaemias, the rapid diagnosis of these clinically severe diseases in our laboratory has permitted prompt treatment in many cases and saved some lives. Before our facilities for organic acid detection were set up, suspected samples were sent abroad and not uncommonly many patients died before the diagnosis was made. This emphasizes the importance of the local establishment of techniques for the detection of severe and lethal disorders for which effective therapy is available.

The rarity, heterogeneity and complexity of IEM are general problems to be addressed by services that work on the diagnosis of these diseases. The investigation of high-risk patients in specialized centres, allowing the combination of relatively low investment and high technical quality, seems to be an adequate alternative for Brazil, which is potentially applicable to other developing countries.

Table 4. IEM diagnosed in the 17,822 patients who completed the investigation

Group	IEM	n	%	
Lysosomal				
Storage disorders	Mucopolysaccharidosis		867	
	I	81		
	II	63		
	VI	65		
	III A, B, C	57		
	IV A, B	52		
	VII	6		
	Not classified	47		
	Gaucher disease	197		
	GM1 gangliosidosis	103		
	Metachromatic Leukodystrophy	48		
	Niemann-Pick disease Type A, B or C	43		
	Krabbe disease	27		
	GM2 galglisidosis Tay-Sachs disease	25		
	Sandhoff disease	9		
	Mucopolidosis type II or III	14		
	Fabry disease	13		
	Galactosialisosis	9		
	Sialidosis	6		
	Multiple sulphatase Deficiency	2		
	Amino acid disorders	Hyperphenylalaninaemia Not classified	80	274
		Classical PKU	66	
		Homocystinuria	36	
Maple syrup urine disease		29		
Non-ketotic hyperglycinaemia		15		
Transient Hyperphenylalaninemia		11		
BH4 metabolism defects		8		
Hereditary tyrosinaemia		7		
Others		22	101	
Organic acidaemias		Lactic acidaemia	19	
	Methylmalonic acidaemia	16		
	3-OH-3ME glutaric acidury	11		
	Glutaric acidaemia	11		
	Primary hyperoxaluria	10		
	Propionic acidaemia	8		
	Others	26		
Carbohydrate disorders	Gycogenesis	39	77	
	Galactosaemia	37		
	Pentosuria	1		
Miscellaneous a) Transport	Cystinuria	23	33	
	Hypophosphataemic rickets	6		
	Others	4		
b) Peroxisomal	X-linked adrenoleukodystrophy	28	39	
	Zellweger syndrome	4		
	Others	7		
c) Metal and heme, others	Porphyria	13	69	
	X-linked ichthyosis	9		
	Lesch-Nyhan syndrome	5		
	Others	42		
Total		964	100	

Acknowledgements

We would like to thank the biologists, biochemists, graduate and post-graduate students who contributed to the work developed at our centre, as well as all physicians who referred the patients to be included in this sample. We are also indebted to foreign laboratories which kindly performed confirmatory analysis in selected cases. We are also grateful to all patients and their families for participating in this study. This study was supported by PRONEX, GPPG/HCPA, CAPES, CNPq, FAPERGS and PROPESP/UFRGS.

References

- Hoffmann GF. Selective screening for inborn errors of metabolism — past, present and future. *Eur J Pediatr* 1994;153:S2-S8.
- Smith I, Seakins JWT. *Chromatographic and electrophoretic techniques*. 4th ed. Bath, William Heinemann, 1976.
- Thomas GH, Howell RR. *Selected screening tests for genetic metabolic diseases*. Chicago, Year Book Medical publishers, 1973.
- 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.
- Wannmacher CMD, Wajner M, Giugliani R, Giugliani ERJ, Costa MG, Giugliani MCK. Detection of metabolic disorders among high risk patients. *Brazil J Genetics* 1982;6:187-94.
- Chamoles N, Campoy C, Jorge L, Fusta M, Manescau M, Blanco M, et al. Detección de enfermedades metabólicas en un periodo de 24 años. *Proceedings of the 11th Latin American Congress of Genetics*; 1994; Puerto Vallarta, Mexico.
- Giugliani R, Coelho J, Barth ML, Dutra-Filho CS, Goldenfum SL, Wajner M. Seven-year experience of a reference Laboratory for detection of inborn errors of metabolism in Brazil. *J Inher Metab Dis* 1991;14:400-2.
- Severini MHA, Silva DMD, Sopelsa A, Coelho JC, Giugliani R. High frequency of type 1 GM1 gangliosidosis in southern Brazil. *Clin Genet* 1999;56:168-9.
- Cicerón VM, Pérez M, Ibarra I, Velázquez A. Estudio de los errores innatos del metabolismo en México. *Proceedings of the 11th Latin American Congress of Genetics*. 1994; Puerto Vallarta, Mexico.
- Cornejo V, Raimann E, Godoy X, Duran G, Colombo M. Análisis en el diagnóstico y tratamiento de los errores congénitos del metabolismo en Chile 1970-1994. *Proceeding of the 11th Latin American Congress of Genetics*. 1994; Puerto Vallarta, Mexico.
- Barrera LA, Uribe A. Errores innatos del metabolismo (EIM) Ocho años de investigación en Colombia. *Proceedings of the 11th Latin American Congress of Genetics*. 1994; Puerto Vallarta, Mexico.
- Velázquez A, Mize S, Cornejo V, Vela M. Study of inborn errors of metabolism in Latin America: results of a survey. *Proceedings of the 11th Latin American Congress of Genetics*. 1994; Puerto Vallarta, Mexico.

Programa de monitoramento de defeitos congênitos: experiência do estudo colaborativo latino-americano de malformações congênitas no HCPA

Júlio César Loguercio Leite¹, Nina Rodrigues Stein¹,
Liliam Pontes Troviscal¹, Roberto Giugliani¹

OBJETIVOS: Os autores apresentam os resultados da análise dos registros do Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos, vinculado ao Estudo Colaborativo Latino-americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), no período de janeiro de 1993 a dezembro de 2000. Trata-se de um registro de base hospitalar, com delineamento tipo caso-controle, que funciona em aproximadamente 70 hospitais distribuídos em 10 países da América Latina. Discutem a importância do desenvolvimento de programas de registro de defeitos congênitos com o objetivo de oferecer aos órgãos governamentais a possibilidade de adotar políticas de saúde baseadas na prevenção primária de alguns destes defeitos.

MATERIAIS E MÉTODOS: O PMDC/ECLAMC é um estudo que iniciou em 1983 no HCPA e está em andamento contínuo desde então. No presente trabalho foram considerados todos os nascimentos ocorridos entre janeiro de 1993 e dezembro de 2000. Foram incluídos todos os recém-nascidos com peso $\geq 500g$, nativos e natimortos. Os meses de abril e novembro de 2000, representando apenas 2% dos nascimentos do ano foram excluídos por problemas técnicos, fato que não interferiu na análise final. A partir das fichas de nascidos vivos malformados, controles e natimortos, foi elaborado um banco de dados utilizando o Epiinfo 6. Estes dados foram posteriormente analisados, vindo a constituir os resultados deste estudo.

RESULTADOS: No período de janeiro de 1993 a dezembro de 2000, nasceram 31.680 crianças no HCPA, sendo 31.090 nascidos vivos e 590 natimortos. Foram detectados defeitos congênitos em 1632 (5,25%) dos RNV e em 72 (12,20%) dos NM, perfazendo um total de 1.704 malformados. Quando consideramos os defeitos congênitos agrupadamente, observa-se uma variação temporal sem efeito epidemiológico na população. Gemelaridade foi identificada como um fator de risco para a ocorrência de malformações, com um OR de 2,64 (IC: 1,30 – 5,47). A realização do acompanhamento de pré-natal e idade materna abaixo de 35 anos foram identificados como fatores protetores com um OR de 0,78 (IC: 0,64 – 0,96) e 0,84 (IC: 0,76 – 0,93) respectivamente.

CONCLUSÕES: A implantação de programas semelhantes em outras maternidades e o vínculo com instituições voltadas à pesquisa sobre defeitos congênitos beneficiaria muito as famílias e a população regional.

Unitermos: Programa de monitoramento; defeitos congênitos.

¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondência: Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Birth defects surveillance program: experience of the Latin American study of congenital malformations at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

OBJECTIVES: The authors show here the result of the registry analysis of the Birth Defects Surveillance Program, linked to the Latin American Study of Congenital Malformations (ECLAMC), from January 1993 to December 2000. This is a hospital-based registry, with a case-control design, which is carried out in 70 hospitals of Latin America. The importance of the development of registry programs of birth defects with the purpose of offering to government agencies the alternatives for the primary prevention of some congenital malformations. Some research projects, carried out in collaboration with ECLAMC, are also presented.

MATERIALS AND METHODS: PMDC/ECLAMC was established in 1983 at Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and it has not been interrupted since then. All births that occurred from January 1993 to December 2000 were considered in this study. We included in the study all newborns weighing $\geq 500g$, either liveborn or stillborn. April and May 2000 represented only 2% of births in that year and were excluded due to technical problems, which did not have a significant influence on the final analysis. A database, based on the registers of malformed liveborns, controls and stillborns was created with Epiinfo 6. These data were then analyzed, and they constitute the results of this study.

RESULTS: Between January 1993 and December 2000, 31,680 children were born at HCPA, Among them, 31,090 were liveborns and 590 were stillborns. Birth defects were detected in 1632 (5.25%) of liveborns and in 72 (12.20%) of stillborns, totalizing 1,704 malformed children. When all birth defects are considered, it is possible to observe a time variation without epidemiological effect on the population. Twin pregnancy was identified as a risk factor for the occurrence of malformation, with $OR=2.64$ (CI: 1.30 – 5.47). The performance of prenatal follow-up and maternal age under 35 years were identified as protecting factors with $OR=0.78$ (CI: 0.64 – 0.96) and 0.84 (IC: 0.76 – 0.93), respectively.

CONCLUSIONS: The establishment of similar programs in other maternities and the connection with institutions involved with research on birth defects would bring important benefits to families and regional population.

Key-words: surveillance program; birth defects.

Revista HCPA 2001(3):293-300

Introdução

As anomalias congênitas (alterações morfológicas macroscópicas presentes ao nascimento) fazem parte de uma vasta categoria de defeitos congênitos, juntamente com o retardo mental de origem pré-natal, os erros inatos do metabolismo e outros distúrbios de origem principalmente genética (1). Sob uma visão biológica, são representantes de um grupo heterogêneo de distúrbios do desenvolvimento embrio-fetal, 60% dos quais ainda são de etiologia desconhecida (tabela 1).

A diminuição da taxa de mortalidade no primeiro ano de vida, obtida a partir do controle das doenças infecto-contagiosas e da melhora da assistência pré-natal com subsequente diminuição dos casos de prematuridade e problemas perinatais, determinou o crescimento proporcional de outros fatores responsáveis por esses eventos, levando as anormalidades congênitas a assumir o primeiro lugar como causa de morte nesse período (2).

Em nosso país, as grandes diferenças

Tabela 1. Etiologia dos defeitos congênitos

Etiologia	%
Genética	
herança monogênica	20%
alterações cromossômicas	3 – 5%
Ambiental	
radiação ionizante [§]	< 1%
infecções pré-natais	2 – 3%
doença materna crônica	1 – 2%
agentes ambientais e fármacos	4 – 5%
Causas desconhecidas	60%

[§] Modificado: Kalter & Warkani (1).

regionais levam a dados contrastantes: algumas regiões apresentam taxas de mortalidade infantil semelhante a dos países desenvolvidos, enquanto outras são tão elevadas quanto às das nações mais pobres do planeta. Alguns estudos mostram que a melhoria dos indicadores de saúde infantil e a conseqüente diminuição da mortalidade transformam as anomalias congênitas em um sério problema de saúde, dado os altos custos dos tratamentos e as freqüentes internações das crianças afetadas. A criação de registros de base hospitalar, associados à implementação de medidas de prevenção primária direcionada para zonas de risco, são alternativas, economicamente viáveis, que contribuem para minimizar esses custos (3).

A abordagem epidemiológica dos defeitos congênitos é a coluna dorsal da pesquisa das suas causas. A observação experimental dos efeitos teratogênicos permite levantar algumas hipóteses a serem testadas, usualmente por métodos epidemiológicos. Algumas estratégias podem ser estabelecidas para propósitos mais amplos, como o registro de variáveis como o uso de medicações pelas gestantes, a saúde dos pais, riscos ocupacionais, o nível sócio-econômico e a história familiar.

A maioria dos estudos de vigilância disponíveis cobre o período pré-natal e pós-natal imediato (até a alta da criança). Poucos estendem este período do neonatal tardio até o primeiro ano de vida (4). Desde a catástrofe da talidomida em 1961, vários esquemas para registro e

identificação de defeitos congênitos têm sido estabelecidos em diversos países. A maioria destes programas têm o propósito de identificar, tão logo quanto possível, qualquer agente contaminante do ambiente que possa oferecer risco teratogênico.

Baseado no Departamento de Genética do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, o Estudo Colaborativo Latino-americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), opera um programa de vigilância epidemiológica de defeitos congênitos, processando os dados enviados por cerca de 70 hospitais distribuídos em 10 diferentes países da América do Sul e do Caribe.

O Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) passou a integrar o ECLAMC a partir de 1983, primeiramente na modalidade coorte e a partir de 1986 na modalidade caso-controle. O Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos (PMDC) do HCPA segue as normas operacionais do ECLAMC, inclusive na definição de quais anomalias devem ser registradas (tabela 2).

Objetivos

O objetivo principal do PMDC/ECLAMC é monitorar os nascimentos ocorridos no HCPA, através de um estudo caso-controle, para observar o comportamento das freqüências de alguns defeitos congênitos em nossa população e associar os dados a possíveis fatores de risco. Todo este esforço contribui para indicar possíveis medidas preventivas, com o intuito de diminuir a

Tabela 2. Relação dos defeitos congênitos registrados pelo PMDC/ ECLAMC

Defeitos da parede abdominal	Onfalocele; gastrosquise.
Defeitos do sistema nervoso	Anencefalia; espinha bífida; hidrocefalia; cefaloceles; microcefalia.
Defeitos da face e estruturas relacionadas	Microftalmia; microtia; palato/lábio fendidos.
Defeitos cardíacos	CIA; CIV; PDA; dextrocardia; cardiopatias NE
Defeitos gastrointestinais	Atresia esofágica; duodenal; ID; anus imperfurado; má rotação intestinal.
Defeitos dos genitais	Genitais ambíguos; hipospádias; epispádias; extrofia de cloaca e bexiga.
Defeitos renais	Agenesia renal; rins policísticos; hidronefrose.
Defeitos de membros	Pés tortos; polidactilias pré e pós-axiais; sindactilias; amelias; amputações congênitas; hipoplasias; defeitos de redução.
Miscelânea	Hérnia diafragmática; ciclopia; Sirenomelia; acardiocefalia; síndrome de Down.

prevalência destas malformações e, se possível, detectar algum fator ambiental ainda desconhecido que possa estar influenciando no desenvolvimento dos fetos. O PMDC, ao manter um registro ininterrupto dos nascimentos no HCPA, disponibiliza um valioso banco de dados para o desenvolvimento de estudos sobre defeitos congênitos.

Materiais e métodos

O PMDC/ECLAMC é um estudo que iniciou em 1983 no HCPA e está em andamento contínuo desde então. No presente trabalho foram considerados todos os nascimentos ocorridos entre janeiro de 1993 e dezembro de 2000. Foram incluídos todos os recém-nascidos com peso ³ 500g, nativos a natimortos. Os meses de abril e novembro de 2000, representando apenas 2% dos nascimentos do ano foram excluídos por problemas técnicos, fato que não interferiu na análise final.

Foram excluídas crianças que nasceram em outros locais, como no domicílio ou vias públicas, e que foram encaminhadas ao HCPA nas primeiras horas de vida, com exceção daquelas incluídas no censo diário. Os recém-nascidos que se enquadraram nos critérios de inclusão para o estudo foram examinados nas primeiras 24 horas de vida por um equipe treinada

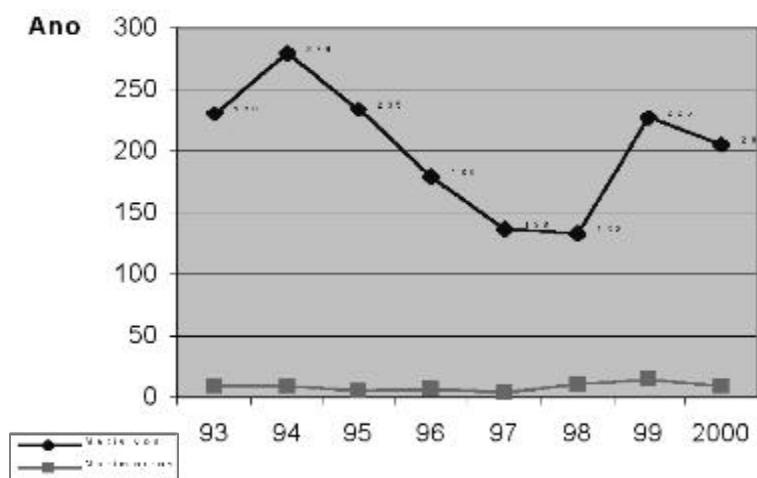
no exame dismorfológico. A equipe de examinadores era constituída por 15 estudantes da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, orientados por um médico vinculado ao ECLAMC.

Para os recém-nascidos vivos, no caso da detecção de alguma malformação, era preenchida uma ficha pelo examinador responsável através de uma entrevista com a mãe. Nesta ficha são coletadas informações sobre consultas pré-natais, exposição gestacional a fatores de risco para malformações, irmandade, consangüinidade, história familiar e dados do parto. As malformações eram descritas nesta ficha de forma detalhada e padronizada por um protocolo. O próximo recém-nascido vivo do mesmo sexo e sem malformações era o controle, e para este era preenchida uma ficha idêntica, exceto pela descrição das malformações. Foram incluídas em nosso estudo tanto as malformações maiores quanto as menores isoladas. Os fetos polimalformados, portadores de síndromes etiológicas conhecidas ou de complexos malformativos não foram incluídos em nossa análise por serem de etiologia heterogênea, cujo diagnóstico preciso pode levar mais tempo e ter maior risco de erro.

No caso de natimortos sempre era preenchida uma ficha com a mãe. Estes recém-nascidos eram necropsiados no Serviço de Patologia do HCPA, e aqueles sem

Tabela 3. Características da amostra de recém-nascidos entre 1993 e 2000 no HCPA

Característica	Casos	%
Recém-nascidos vivos não-malformados	29.458	94,75
Recém-nascidos vivos malformados	1.632	5,25
Recém-nascidos mortos não-malformados	518	87,80
Recém-nascidos mortos malformados	72	12,20

**Figura 1.** Número total de recém-nascidos malformados (nativos e natimortos) no período de 1993 a 2000 no HCPA.

malformações tinham suas fichas excluídas. Os natimortos malformados tinham a descrição de suas malformações preenchida de acordo com os dados da necropsia, não havendo controles nesses casos.

A partir das fichas de nascidos vivos malformados, controles e natimortos, foi elaborado um banco de dados utilizando o Epiinfo 6. Estes dados foram posteriormente analisados, vindo a constituir os resultados deste estudo.

Para a análise foram considerados de maior relevância os valores de *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95%, e a distribuição de *POISSON*, utilizada pelo ECLAMC, para análise de dados.

Resultados

No período de janeiro de 1993 a dezembro de 2000, nasceram 31.680 crianças no HCPA, sendo 31.090 nascidos vivos e 590 natimortos. Foram detectados defeitos congênicos em 1.632 (5,25%) dos RNV e em 72 (12,20%) dos NM, perfazendo um total de 1704 malformados (tabela

3). A figura 1 demonstra as variações temporais que ocorreram no período estudado. Quando consideramos os defeitos congênicos agrupadamente, observa-se uma variação temporal sem efeito epidemiológico na população.

Na tabela 4 podemos observar as malformações de maior importância clínica, bem como o número de casos no HCPA e suas taxas por 10 mil nascimentos neste hospital. Estas taxas foram comparadas com as fornecidas pelo Estudo Colaborativo Latino-americano de Malformações Congênicas, obtidas a partir dos dados coletados em 70 hospitais da América Latina.

Gemelaridade foi identificada como um fator de risco para a ocorrência de malformações, com um OR de 2,64 (IC: 1,30 – 5,47). A realização do acompanhamento de pré-natal e idade materna abaixo de 35 anos foram identificados como fatores protetores com um OR de 0,78 (IC: 0,64 – 0,96) e 0,84 (IC: 0,76 – 0,93) respectivamente (tabela 5).

Tabela 4. Malformações maiores observadas no período 1993- 2000 em recém-nascidos no HCPA e no total do ECLAMC

	n		n		n	Poisson 2a = 0,05
	HCPA		ECLAMC			
	31.680		3.180008*		Por ano	
	n	taxa HCPA/10.000	n	taxa ECLAMC/ 10.000		
Agenesia renal	15	4,73	443	1,39	1	0-4 +
Anencefalia	23	7,3	2208	6,94	7	1-14
Ânus imperfurado	9	2,85	1328	4,18	4	0-9
Atresia duodenal	6	1,8	291	0,92	1	0-4 +
Espinha bífida	33	33,0	2485	7,81	8	2-15
Gastrosquise	23	7,3	394	1,24	1	0-4 +
Hidrocefalia isolada	17	5,37	2404	7,56	8	2-15
Lábio leporino	34	10,73	3527	11,09	11	4-19
Pálato fendido	26	8,2	1158	3,64	4	0-9
Onfalocele	14	4,4	800	2,52	3	0-8
Hérnia diafragmática	22	6,9	695	2,19	2	0-6
Atresia esofágica	10	3,1	911	2,86	3	0-8
Síndrome de Down	49	15,46	5056	15,90	16	8-25

Discussão

Os resultados observados não diferem muito dos encontrados na literatura (5). As diferenças nas freqüências de malformações em relação ao resto do ECLAMC (tabela 4) vêm sendo monitoradas pelo PMDC/ ECLAMC há alguns anos. Podemos considerar que estas prevalências ao nascimento como não sendo um *alarme* (termo usado em epidemiologia de defeitos congênitos para definir qualquer mudança no comportamento de uma anomalia congênita, cuja freqüência altera-se em determinado período de tempo, indicando assim um provável efeito ambiental sobre a base etiológica já existente). A explicação para isto estaria baseada no fato de que para o HCPA converge uma grande parte dos fetos malformados detectados no período pré-natal, por tratar-se de um centro de referência em tratamento e em diagnóstico. Não houve a detecção em hospitais vinculados ao ECLAMC de taxas aumentadas para a região de Porto Alegre, corroborando esta conclusão (5). Ao

levar-se em conta a procedência dos casos das mais variadas regiões do estado, não se observa nenhum *cluster* (6).

Os únicos defeitos que apresentaram aumento em relação ao esperado por ano foram os que apresentam um sinal “+” na tabela 4: agenesia renal, atresia duodenal e gastrosquise, aparecem aumentadas pelos mesmos fatores indicados anteriormente, tratam-se de defeitos cujo diagnóstico pré-natal sofreu um impulso considerável com advento da ultra-sonografia morfológica e de melhor qualidade e o encaminhamento para centros de referência é rotina nestes casos (5).

Quanto aos fatores de risco, gemelaridade é sabidamente uma das principais causas de anomalias congênitas na espécie humana. Em torno de duas a três vezes é mais comum a ocorrência de anomalias estruturais em gêmeos monozigóticos do que em dizigóticos e gestações de feto único (7).

Ao analisarmos a realização do pré-natal e idade materna, as observações são interessantes. O primeiro sugere que no grupo

Tabela 5. Investigação de fatores de risco

	Malformado	Controle	OR	IC
Pré-natal realizado	983	980	}	0.82
Pré-natal não realizado	335	273		
Idade < 35 anos	1457	1405	}	0.87
Idade >35 anos	236	197		
Doenças agudas	647	605	}	1.04
Ausência de doenças agudas	1037	1006		
Doenças crônicas	319	287	}	1.08
Ausência de doenças crônicas	1366	1324		
Tabagismo	127	112	}	1.11
Ausência de tabagismo	665	651		
Medicamentos durante gestação	1152	1093	}	1.02
Sem uso de medicamentos durante gestação	533	518		
Gestação gemelar	38	15	}	2.44
Gestação de feto único	1665	1601		

OR = *odds ratio*; IC = intervalo de confiança.

de gestantes que realizaram o acompanhamento pré-natal houve um menor número de recém-nascidos malformados em relação ao grupo de mães que não o fizeram. A explicação para esta observação pode estar na estratificação social das gestantes da amostra; mulheres com melhor índice sócio-econômico têm mais acesso aos serviços de saúde, condições de alimentação mais adequadas, informações referentes ao uso do ácido fólico e outras terapias capazes de reduzir a ocorrência e recorrência de determinados defeitos congênitos.

O outro fator de risco encontrado com um valor significativo foi idade materna avançada. Ter mais de 35 anos está associado ao nascimento de crianças portadoras de defeitos congênitos, o que já se sabe desde os trabalhos de Penrose na década de 30, que demonstrou a relação entre idade materna avançada e síndrome de Down, 25 anos antes de ser conhecida a etiologia cromossômica numérica envolvida (trissomia do cromossomo 21 em 95% dos casos) (8).

O número de mulheres com 40 anos ou

mais é responsável por 2% dos nascimentos na América Latina e por 40% dos casos de síndrome de Down nessa região. A adoção de medidas preventivas baseadas na informação e educação da população para reduzir a idade de procriação permitiria evitar o nascimento de 30% dos casos de síndrome de Down sem necessidade de empregar uma tecnologia complexa e cara (8).

A implantação de programas semelhantes em outras maternidades e o vínculo com instituições voltadas à pesquisa sobre defeitos congênitos beneficiaria muito as famílias e a população regional.

A seguir listamos alguns sub-projetos desenvolvidos a partir do PMDC/ ECLAMC:

1. CAMPO 34: pela primeira vez em nosso país é estabelecida uma parceria entre o ECLAMC e uma secretaria de município, no caso a Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, apoiando o desenvolvimento de um registro de anomalias congênitas, com o uso da nova Declaração de Nascidos Vivos (DN), documento oficial de caráter federal e de preenchimento

obrigatório em todas as maternidades, implantado a partir de janeiro de 2000;

2. MOLECLAMC: trata-se de um grande banco de DNA, para futuros estudos relacionados à etiologia molecular e a patogenia dos defeitos congênitos. Há uma cópia do projeto disponível no *site* do ECLAMC (www.biologia.ufrj.br/sociedades/eclamc);

3. SONOECLAMC: associado ao desenvolvimento da ultra-sonografia busca, através do registro precoce de fetos malformados, definir uma prevalência mais acurada para determinados defeitos congênitos. Realizado em associação com os grupos de medicina fetal e diagnóstico pré-natal, acompanhando o feto desde o diagnóstico até o desfecho da gestação, seja o nascimento ou a interrupção.

Referências

1. Guidelines for the development of national programmes for monitoring birth defects. The International Centre for Birth Defects of the International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems (ICBDMS). Rome: WHO, Hereditary Diseases Programme; 1993. p 4.
2. *Prá-saber: informações de interesse à saúde*. Secretaria Municipal de Saúde, Centro de Vigilância em Saúde; Equipe de Informação em Saúde. Porto Alegre: CEDIS; 2000.
3. Leite, JCL. *Frequência de defeitos congênitos em região carbonífera: um estudo no Rio Grande do Sul [dissertação]*. Porto Alegre, UFRGS; 2000.
4. WHO. *World atlas of birth defects, human genetics programme*. World Health Organization; 1998.
5. ECLAMC. *Documento final XXXII; Reunião Anual*, Canela, 2000.
6. Castilla EE, Lopez-Camelo JS. *The surveillance of birth defects in South America*. In: *The search for time clusters: Epidemics. Advances in mutagenesis research 2*. Obe G, editor. New York: Springer-Verlag; 1989. p.191-209.
7. Jones KL. *Smith's recognizable patterns of human malformation*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997. p. 652-3.
8. Castilla EE, Lopez-Camelo JS, Paz JE, Orioli IM. *Prevenção primaria de los defectos congénitos*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1996. p. 20-1.

Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas

**Maria T. V. Sanseverino¹, Rejane G. Kessler¹, Maira G. Burin¹,
Nina R. Stein², Rafaela F. Herman², Ursula Matte¹,
Patrícia M. M. Barrios³, José A. Magalhães⁴**

OBJETIVO: O desenvolvimento de técnicas para diagnosticar as condições genéticas intra-útero foi um grande avanço na genética clínica, mudando a perspectiva reprodutiva de famílias de risco. No Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), o programa de diagnóstico pré-natal (DPN) de anomalias congênitas faz parte do Grupo de Medicina Fetal, que é composto por uma equipe multidisciplinar, cuja meta principal é estudar, analisar, diagnosticar e aconselhar as gestantes de alto risco. O trabalho apresentado aqui tem como objetivos revisar os principais procedimentos de diagnóstico pré-natal, descrever a nossa amostra e os exames que são oferecidos às nossas gestantes.

MATERIAIS E MÉTODOS: De janeiro de 1989 a julho de 2001, foram cariotipadas 613 gestações, realizadas investigações enzimáticas em 86 casos e em 4 foram realizados estudos moleculares em material fetal. Um total de 1.378 novos casos foram avaliados no ambulatório de DPN do HCPA, de julho de 1993 a julho de 2001, para aconselhamento genético reprodutivo.

RESULTADOS: O diagnóstico pré-natal de cromossomopatias realizado no HCPA atingiu uma taxa de crescimento de culturas de 98%, índice semelhante ao dos países desenvolvidos.

CONCLUSÕES: O diagnóstico pré-natal é um importante recurso para as famílias com risco de anomalia fetal. Novas técnicas de diagnóstico estão em implantação no HCPA, e poderão contribuir ainda mais para o atendimento dessas famílias. Apresentamos também os aspectos éticos envolvidos e algumas perspectivas futuras na área do diagnóstico pré-natal de anormalidades congênitas.

Unitermos: Diagnóstico pré-natal; aconselhamento genético; cromossomopatias; erros inatos do metabolismo; malformações congênitas.

Prenatal Diagnosis: advances and prospectives

OBJECTIVE: The development of laboratorial techniques for the prenatal diagnosis of genetic diseases was a great step for clinical genetics, changing reproductive perspectives of high risk families. At Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), the prenatal diagnosis program is part of the Fetal Medicine Group, which includes several professionals of different areas. The main objective of this group is to study, evaluate, diagnose and

¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondência: Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³ Serviço de Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁴ Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

advice high risk pregnant women. The aim of the present study is to review the main procedures for the prenatal diagnosis and to show the results of our sample regarding the laboratory analysis offer to the pregnant women.

MATERIALS AND METHODS: From January 1989 to July 2001, karyotypes were performed for 613 pregnancies, metabolic studies were carried out in 86 pregnancies and molecular analysis was performed for four cases. Prenatal genetic counseling was given to 1,378 families.

RESULTS: The prenatal diagnosis of genetic diseases accomplished at HCPA reached a culture growth rate of 98%, which is similar to the result of developed countries.

CONCLUSIONS: The prenatal diagnosis is an important tool for the families that are likely to have fetal anomalies. New techniques of diagnosis are being introduced at HCPA, and they will contribute even more to the treatment of these families. Future perspectives and ethical aspects for prenatal diagnosis are also discussed.

Key-words: Prenatal diagnosis; genetic counseling; chromosomal anomalies; inborn errors of metabolism; congenital malformations.

Revista HCPA 2001(3):301-316

Introdução

O diagnóstico pré-natal permite a detecção, ainda no útero, de doenças que de outra forma somente seriam diagnosticadas após o nascimento. Milunsky, já em 1973, definiu como sendo a filosofia fundamental do diagnóstico pré-natal oferecer a um casal sob risco a possibilidade de ter uma criança normal, mesmo que a chance de ocorrer algum defeito seja extremamente elevada (1).

A partir dos anos 70, o desenvolvimento de técnicas como o cariótipo e ensaios enzimáticos em células fetais, a determinação de metabólitos no líquido amniótico e a ultra-sonografia propiciaram o diagnóstico pré-natal de desordens genéticas. Neste contexto, a amniocentese estabeleceu-se como técnica importante da obstetrícia moderna, associada a métodos precisos de diagnóstico e a um relativo baixo risco. O reconhecimento da alfa-fetoproteína, nos anos 70, um marcador para a detecção pré-natal de defeitos do tubo neural, abriu espaço para novas descobertas no campo da triagem sérica materna, tornando-se um importante avanço no diagnóstico pré-natal e abrindo a perspectiva de detecção pré-natal de defeitos fetais em gestações não suspeitas de risco. Com a coleta e a análise de vilosidades coriônicas, possibilitou-se um diagnóstico pré-natal mais precoce, ainda no primeiro trimestre, reduzindo a ansiedade da espera dos resultados para os casais em risco (1,2). Essas técnicas continuam sendo aperfeiçoadas e outras novas estão sendo descobertas.

O diagnóstico pré-natal possibilita a casais em risco terem filhos, o que não ocorreria caso o procedimento não estivesse disponível. O resultado imediato é que o número de crianças saudáveis nascidas é muito mais alto do que o número de gestações interrompidas por causa de detecção de um defeito grave (1).

No Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), o programa de diagnóstico pré-natal de anomalias congênitas está inserido no Grupo de Medicina Fetal, do qual fazem parte obstetras, geneticistas clínicos, neonatologista, enfermeiras, psicólogas, cardiologista pediátrico, citogeneticista, bioquímico e patologista.

O objetivo deste artigo é abordar os assuntos pertinentes ao cotidiano do diagnóstico pré-natal, apresentar os resultados de nosso trabalho nos últimos anos e revisar algumas perspectivas futuras.

O aconselhamento genético no diagnóstico pré-natal

O desenvolvimento de técnicas para diagnosticar as doenças genéticas intra-útero foi um grande avanço na genética clínica, mudando a perspectiva reprodutiva das famílias de risco e tornando o diagnóstico pré-natal parte integrante do processo de aconselhamento genético (3).

Freqüentemente, os procedimentos diagnósticos (amniocentese, coleta de vilosidades) acabam substituindo o aconselhamento genético nas gestações com risco elevado de anomalias. O

prejuízo pode ser grande, uma vez que um risco genético adicional, além daquele que motivou o exame e que não havia sido esclarecido previamente, pode estar presente em um número significativo de casos (4).

O momento ideal de aconselhamento genético com vistas ao diagnóstico pré-natal é antes da concepção (1, 3), para que, com tempo, se possa estabelecer o diagnóstico correto da condição, realizar exames adicionais nos pais quando necessário e disponível (cariótipo, estudos moleculares, etc), estabelecer o risco efetivo de recorrência, identificar se existem métodos diagnósticos pré-natais disponíveis, esclarecer os riscos e os custos envolvidos, discutir as alternativas decorrentes de um diagnóstico pré-natal normal ou anormal, permitindo ao casal uma decisão reprodutiva mais consciente. Por outro lado, o planejamento da gestação pode também contribuir para diminuição da recorrência de algumas patologias, como no uso periconcepcional de ácido fólico que diminui em 70% a recorrência dos defeitos de fechamento de tubo neural (5). Mais freqüentemente, porém, a gestante ou o casal são atendidos no curso da gestação, e corre-se contra o tempo na tentativa de oferecer a investigação mais adequada.

Na gestação, alguns aspectos importantes devem ser abordados com o casal durante a consulta de aconselhamento genético e antes da realização de exames invasivos. Devem fazer parte da avaliação: história obstétrica, história clínica e história familiar do casal, qual a anormalidade de risco e a probabilidade de ocorrência, qual o exame disponível e como vai ser realizado, qual o tempo de espera até o resultado, quais diagnósticos podem ser obtidos através deste exame, quais os riscos envolvidos na realização do procedimento invasivo e quais as conseqüências de um resultado anormal (6). Alguns aspectos importantes para a tomada de decisão pelo casal incluem a reflexão sobre algumas questões: 1. Estão de acordo com o procedimento invasivo; 2. se o feto for anormal, o que eles pensam que deve ser feito; 3. qual o impacto de uma interrupção de gestação; 4. no futuro, devem tentar uma nova gestação? Quando? (7).

A ansiedade do casal até a obtenção do resultado após um exame invasivo está sempre presente. No entanto, costuma ser maior naquelas pacientes inicialmente de baixo risco, que são surpreendidas durante a gestação pela necessidade deste exame por uma alteração na

triagem sérica ou anormalidades na ecografia (6).

A comunicação de um resultado anormal é uma das etapas mais difíceis do processo. A elaboração e a tomada de decisão é facilitada quando a paciente ou o casal foi adequadamente informado da possibilidade de ocorrência da anormalidade e das conseqüências do problema, e já refletiu sobre as diversas possibilidades, conversou com pessoas do seu grupo familiar e social, antes de ser confrontado com a necessidade de decidir pela continuidade ou não da gestação.

Uma particularidade que torna o processo de aconselhamento genético para diagnóstico pré-natal ainda mais complexo em nosso meio é a inexistência de legislação a respeito da interrupção da gestação nos casos de anomalia fetal no Brasil, abordada a seguir nos aspectos éticos.

Materiais e métodos

A experiência do ambulatório de aconselhamento genético para diagnóstico pré-natal (DPN)

Entre 1993 e julho de 2001, 1.378 novos casos foram atendidos no Ambulatório de Aconselhamento Genético para Diagnóstico Pré-Natal (DPN) do Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A consulta inicial envolvia uma gestação em curso em 923 casos (67%). As pacientes são encaminhadas para este ambulatório a partir de profissionais do SGM, de obstetras do HCPA ou através de Postos de Saúde.

Apresentamos, na tabela 1, a distribuição das consultas quanto ao motivo principal de encaminhamento ao ambulatório. A idade materna avançada foi o motivo mais freqüente das consultas (21,4%). Em conjunto, os antecedentes familiares desfavoráveis estavam presentes em 551 casos (40%).

A seguir, apresentamos algumas técnicas utilizadas para o diagnóstico pré-natal e a nossa experiência com cada uma delas.

Triagem sérica materna

A triagem sérica materna foi desenvolvida para identificação de anormalidades fetais em gestantes de baixo risco. A partir da observação da elevação de alfa-fetoproteína (AFP) nos soro de mulheres cujo feto apresentava anencefalia, diversos estudos estabeleceram a correlação

Tabela 1. Motivo Principal de consulta ao Ambulatório de Diagnóstico Pré-Natal

Motivo do encaminhamento	n	(%)
Idade materna avançada	295	21.4
História familiar de malformação	194	14.1
Abortos de repetição	183	13.3
Anomalia na ecografia	177	12.8
História familiar de doença cromossômica	155	11.2
Outro (exposições ambientais, etc)	127	9.2
História familiar de outra doença gênica	119	8.6
História familiar de Erros Inatos do metabolismo	43	3.1
História familiar de defeito de fechamento de tubo neural	40	2.9
Consangüinidade	39	2.8
Total	1378	100

entre os níveis de AFP sérica materna e defeitos de fechamento de tubo neural (DFTN), permitindo o desenvolvimento da triagem sérica universal para estes defeitos (1).

A alfa-fetoproteína é uma proteína produzida no feto pelo saco vitelino, trato gastrointestinal e fígado fetais, a partir de 29 dias após a concepção. Na circulação fetal, os níveis máximos de AFP são observados entre 10 e 13 semanas de gestação. A função biológica da AFP ainda não está estabelecida, havendo evidências de que exerça um papel imunológico, prevenindo a rejeição do feto pelo sistema imune materno. Na circulação materna, observa-se elevação da AFP a partir da 7ª semana de gestação, com pico máximo entre 28 e 32 semanas, em função da maior permeabilidade placentária a proteínas maternas (1).

O resultado da AFP no soro materno é expresso em múltiplos da mediana (MoM). A AFP está elevada nos defeitos de fechamento de tubo neural e nos defeitos fetais abertos, como a onfalocele e gastrosquise. O achado de um nível elevado de AFP deve ser seguido de uma ultrasonografia detalhada para identificação de anomalias fetais. Níveis elevados de AFP no segundo trimestre também têm sido associados a complicações obstétricas, como ruptura prematura de membranas, morte fetal, hipertensão, descolamento de placenta, entre outras (8).

O primeiro marcador sérico materno associado à síndrome de Down foi a AFP (9-11). Entre 1987 e 1988, a dosagem de gonadotrofina corônica humana (*human chorionic gonadotropin* – *hCG*) e de estriol não-conjugado foram identificados também como marcadores séricos que aumentavam a sensibilidade da triagem materna para Síndrome de Down (12). Os estudos demonstraram que a concentração de AFP e de estriol não conjugado eram mais baixas e a concentração de hCG mais alta nas gestações com Síndrome de Down com relação aos controles (13).

Diversos estudos têm demonstrado a viabilidade da realização da triagem sérica já no primeiro trimestre (14). A diminuição dos níveis de AFP nas gestações com Síndrome de Down já pode ser evidenciada entre 9 e 12 semanas. A combinação da dosagem da subunidade livre do beta-hCG (hCG livre) e da proteína A relacionada à gestação (*pregnancy-associated protein A* ou *PAP-A*) tem uma sensibilidade semelhante à triagem de segundo semestre. Nas gestações com Síndrome de Down, a dosagem de hCG livre está elevada e a de PAP-A está diminuída.

A sensibilidade da triagem sérica no segundo trimestre para Síndrome de Down está em torno de 57% para uma taxa de falso-positivo de 5% (15).

Cada laboratório deve estabelecer a sua

Tabela 2. Ultra-sonografia para o diagnóstico pela idade gestacional em diferentes estágios da gestação^a

Até 14 semanas	17 a 20 semanas	20 a 24 semanas	28 a 32 semanas
Número de embriões	Pólo cefálico	Estruturas cerebrais	
Vitalidade embrio-fetal	Coluna vertebral	Face	Anomalias
Pólo cefálico	Face	Tórax e coração	esqueléticas
Coluna vertebral	Parede abdominal	Abdômen e aparelho	Nanismos
Membros	Diafragma	digestivo	Cistos de ovário
	Estômago	Rins	
	Bexiga	Membros e extremidades	
	Órgãos genitais externos		
	Membros e extremidades		

^a Modificado de Isfer, 1988.

curva para os diversos marcadores. No HCPA, estabelecemos a curva de nossas pacientes em líquido amniótico para AFP (16). No entanto, a curva de marcadores séricos ainda não foi estabelecida e, portanto, ainda não oferecemos este exame.

Ultra-sonografia

A ultra-sonografia é uma técnica diagnóstica que permite avaliação anatômica da gestação. O método empregado isoladamente (exame de ultra-som) permite o diagnóstico de aproximadamente 70 a 80% das malformações estruturais ou anatômicas do feto, dependendo da acuidade diagnóstica, da experiência do operador, do tempo despendido para a realização do exame e da qualidade técnica do aparelho empregado.

A ultra-sonografia permitiu que um mundo, antes inexplorado, passasse a ser invadido pelos olhos de todos. Possibilitou que muitas emoções aflorem quando as imagens mostram o que queremos ou o que não queremos ver (17).

Nas diferentes fases da gestação, a ultra-sonografia permite o reconhecimento de elementos distintos da evolução biológica da espécie, como está demonstrado na tabela 2.

Quando se aborda o diagnóstico genético fetal, podemos partir de um marcador ultra-sonográfico para indicar o estudo citogenético.

No HCPA, no período entre 1993 e 1995, realizamos 200 exames para estudo do cariótipo fetal (amniocenteses, BVC e cordocenteses).

Destes casos, 24 foram indicados por anomalia estrutural detectada previamente à ultra-sonografia. Os resultados mostraram 5 gestações com cariótipo alterado, conforme Tabela 3.

Translucência nugal

Outro aspecto que pode ser focado diz respeito a um teste de rastreio de risco gestacional para cromossomopatia (trissomias 21, 18 e 13), que se denomina translucência nugal. Através da medida do subcutâneo da nuca do feto, entre 11 e 14 semanas de idade gestacional (comprimento cabeça-nádega: 45 mm a 84 mm), pode-se selecionar pacientes para exames invasivos, como a biópsia de vilosidades coriônicas (BVC) ou amniocentese, baseado na correlação da espessura nugal aumentada e trissomias. Os cálculos de risco estão calcados em mais de 100 mil exames analisados. O resultado deve ser emitido em um número de probabilidade, levando-se em consideração a idade materna, tempo de gestação, antecedentes obstétricos e a medida da translucência nugal. Não apresenta perigo de perda da gravidez, o exame é realizado apenas por uma ultra-sonografia, indicado principalmente em pacientes de baixo risco pela idade, com menos de 35 anos (18).

Dados sobre valor preditivo positivo para trissomias 13, 18 e 21, calculados em função da medida da translucência nugal, podem ser obtidos na tabela 4.

Tabela 3. Malformações fetais, achados ultra-sonográficos e cariótipos alterados

Malformação	n	Cariótipos alterados
Hidropsia fetal não-rhesus	4*	
Hérnia diafragmática	3*	
Anencefalia	3*	
Dupla bolha	2*	47, XX, +21 (1 caso)
Onfalocele	2*	47, XY, +18 (1 caso)
Dandy-Walker	2*	
Gastrosquise	1*	
Hidrocefalia, CIV	1*	47, XY, +21
Cefalocele	1*	
Meningocele	1*	
Cisto de plexo coróide, dilatação da cisterna magna	1*	47, XX, +18
Hipoplasia cardíaca (ventricular E)	1*	47, XY, +18
Lesão obstrutiva do trato urinário	1*	
Agenesia do fêmur + encurtamento contra-lateral	1	
Total	24	5

HCPA/Setor de Medicina Fetal/1993-1995/JAM.

Tabela 4. Valor preditivo positivo para trissomias em relação à espessura da medida da translucência nucal

Translucência nucal (mm)	Valor preditivo positivo(%)
3	13
4	57
5	80

Nicolaidis, 1993.

Além das trissomias, pode rastrear também síndrome de Turner, triploidia, e outras anomalias cromossômicas.

Defeitos cardíacos, hérnia diafragmática, onfalocele, malformações esqueléticas, anomalias renais, uropatia obstrutiva, e diversas doenças gênicas já foram descritas em associação à translucência nucal aumentada em fetos com cariótipo normal (19,20).

A medida da translucência nucal está sendo oferecida às nossas pacientes. Estamos desenvolvendo um estudo para avaliar o desempenho deste exame em diferentes situações de risco para anomalia fetal.

Ecocardiografia fetal

A ecocardiografia fetal, iniciada no final da década de 70, permite identificar a maioria das

anomalias cardíacas estruturais graves e dos distúrbios do ritmo cardíaco após as 18-20 semanas de gestação, permitindo o tratamento intra-útero das arritmias, o encaminhamento das malformações cardíacas graves para hospitais especializados e o aconselhamento familiar (21, 22).

Um exame ecocardiográfico fetal normal tranqüiliza uma família com fatores de risco para cardiopatia congênita, permitindo uma gestação mais tranqüila e mais prazerosa. O exame ecocardiográfico básico pode ser realizado em condições ótimas entre 18 e 28 semanas de gestação. Alguns defeitos anatômicos podem ser de difícil detecção no início da gravidez devido ao pequeno tamanho do feto, e um exame tardio pode ser prejudicado pelas sombras acústicas geradas pelas costelas fetais e pela diminuição do volume relativo do líquido amniótico em relação ao tamanho do feto.

A projeção de 4 câmaras possui várias características que a tornam um teste adequado de rastreamento para malformações cardíacas fetais e, por isso, faz parte do exame ultrasonográfico obstétrico porque é facilmente visualizada na projeção transversal do tórax fetal, e pode ser obtida sem nenhum treinamento especializado em ultra-sonografia (23). Além disso, pode ser visualizada em todas as posições fetais e em mais de 95% dos exames realizados após 19 semanas de gestação (24).

Sempre que as condições técnicas permitirem, as projeções das vias de saída ventriculares devem ser incluídas como parte de uma avaliação cardíaca fetal de rotina, realizada pelo obstetra. A avaliação dos grandes vasos aumenta a detecção de várias cardiopatias que podem passar despercebidas na projeção de 4 câmaras (25). Algumas malformações cardíacas podem estar presentes com uma imagem de quatro câmaras normais, como a Tetralogia de Fallot, transposição de grandes vasos, dupla via de saída de ventrículo direito, pequenos defeitos dos septos interventricular e atrial, coarctação leve da aorta (26).

É consenso na literatura que a maioria dos recém-nascidos com cardiopatia congênita não possui fatores de risco identificáveis (27). Apesar deste fato, a ecocardiografia fetal tem sido tradicionalmente indicada em gestações com presença de fatores de risco reconhecidos para malformações cardíacas. Os fatores de risco para cardiopatia congênita podem ser agrupados

em três categorias principais: fatores maternos, fatores obstétricos e fetais (28). Os fatores de risco internacionalmente utilizados como critérios de indicação para ecocardiografia fetal estão listados na tabela 5. A ecocardiografia fetal é oferecida às gestantes no HCPA, de acordo com estas indicações, preferencialmente a partir das 20 semanas de idade gestacional.

Procedimentos invasivos

A possibilidade de realizar métodos invasivos em diagnóstico pré-natal foi um grande avanço, pois viabilizou a coleta direta de material fetal para análise em laboratório, permitindo a realização de diversos exames, como o cariótipo para doenças cromossômicas, os ensaios enzimáticos para erros inatos do metabolismo e a análise molecular ainda em vida intra-útero.

Os principais procedimentos invasivos são a biópsia de vilosidades coriônicas (BVC), a amniocentese e a cordocentese. Existem outros procedimentos como punção de bexiga e punção intra-cardíaca, entretanto estes métodos não são utilizados de rotina, sendo reservados para situações especiais.

A BVC é a retirada de fragmentos de placenta através de uma agulha guiada por ultra-sonografia. A via preferencial é a transabdominal. Pode ser realizada entre 11 e 14 semanas, e tem um risco de abortamento de 1 a 1,5%. O material coletado pode ser analisado diretamente e após cultivo, sendo utilizado para estudo citogenético, ensaio enzimático e análise molecular.

A amniocentese é a retirada, por agulha, de líquido amniótico. Ela pode ser realizada com segurança a partir de 15 semanas e tem um risco de abortamento de 0,5 a 1%. Este exame também é guiado por ultra-sonografia, e o material utilizado para análise são as células fetais flutuantes no líquido, e as enzimas que o compõe.

A cordocentese é a punção de vaso umbilical para retirada de amostra de sangue fetal. Uma agulha guiada por ultra-sonografia é introduzida na cavidade amniótica e depois punciona o vaso. Este procedimento é utilizado quando a idade gestacional é avançada demais para a realização de amniocentese e na ausência de líquido amniótico. O risco de perda fetal é de 2-5%.

Tabela 5. Fatores de risco para cardiopatias congênitas

Fatores de risco materno

- Idade maior do que 35 anos
- Portar cardiopatia congênita
- Filho(s) prévio(s) com anomalias congênitas
- Diabetes durante a gestação
- Doenças do colágeno
- Exposição a teratógenos (vitamina A, álcool, quimioterapia, anticonvulsivantes, lítio, vírus, etc.)
- Uso de indometacina e/ou diclofenaco após 28 semanas de gestação

Fatores de risco obstétricos

- Oligodrâmnio
- Polidrâmnio
- Suspeita de cardiopatia fetal no ultra-som obstétrico de rotina

Fatores de risco fetais

- Malformações extracardíacas
- Translucência nucal acima de 3.5 mm entre 11-13 semanas de gestação
- Déficit de crescimento intra-uterino
- Presença de cromossomopatia
- Hidropsia não-imune
- Arritmias cardíacas
- Artéria umbilical única

Adaptada de Abuhamad A (28).

A gestante poderá, dentro de até 48 horas após qualquer dos exames invasivos sofrer perda de líquido amniótico, sangramentos, e poderão ocorrer contrações. Por este motivo está indicado repouso absoluto após o procedimento, pelo menos durante o dia de realização do exame. A perda fetal é a complicação mais grave destes procedimentos.

Por todos estes procedimentos oferecerem riscos, é muito importante que ao serem indicados aos casais, estes tenham realizado previamente uma consulta de aconselhamento genético. É importante que a indicação de um procedimento invasivo seja criteriosa para não expor as pacientes a situações temerárias sem

benefício. As principais indicações para amniocentese ou coleta de vilosidades são apresentadas na tabela 6.

Diagnóstico pré-natal de cromossomopatias no HCPA

Acima de 50% das anomalias congênitas são de causa desconhecida e 6% são devidas a causas cromossômicas (29). Entre 5,6 e 11,5% das mortes perinatais estão associadas a anormalidades cromossômicas (30). Considerando-se estes relevantes dados, a partir dos anos 70, o diagnóstico pré-natal das anormalidades cromossômicas tem sido utilizado

Tabela 6. Indicações para procedimentos invasivos no diagnóstico pré-natal.

Idade materna avançada ^a
História familiar de cromossomopatia
Pais portadores de alterações cromossômicas
Filho anterior polimalformado falecido sem diagnóstico
História familiar de Erro Inato de Metabolismo
História familiar de doenças gênicas que tenham testes moleculares definidos para diagnóstico pré-natal
Anomalias na ultra-sonografia
Triagem materna alterada

^aNo HCPA, usamos o critério de 38 anos de idade na data provável do parto para a indicação de exame.

como um procedimento diagnóstico formal (1).

A amniocentese tradicional, por definição, é a remoção de líquido amniótico por aspiração do saco gestacional (31). Com o auxílio da ultra-sonografia é retirado de 20 a 30 ml de líquido amniótico. Na própria seringa da coleta, o material é levado ao laboratório, centrifugado e ao decantado de células fetais se adiciona meio de cultura, e ambos são transferidos para um frasco de cultura celular. Os frascos são mantidos em estufa de CO₂ a 37°C, durante o período de multiplicação celular, que leva em torno de 10 dias. O meio de cultura é trocado 3 vezes por semana, quando também é acompanhado o crescimento celular ao microscópio invertido. Quando as células estão confluentes e o crescimento celular atinge o nível desejado, as células dos frascos de cultura são colhidas e passam por um processo de hipotonia e posterior fixação. O material fixado é então pingado em lâminas que passam pelo processo de bandeamento GTG e são posteriormente coradas com Giemsa. As metáfases das lâminas são analisadas ao microscópio e o cariótipo é definido.

Resultados

O diagnóstico pré-natal de cromossomopatias surgiu no HCPA pela necessidade de atender às nossas pacientes, que, pelos diversos motivos já citados, procuravam o serviço de genética para o

acompanhamento de gestações de alto risco. Nos países desenvolvidos este tipo de diagnóstico já era fortemente difundido desde a década de 80. Iniciamos então, em nível experimental, no final de 1988, as primeiras tentativas. As condições não eram as mais adequadas para um trabalho tão requintado, e que exigia uma área de trabalho totalmente estéril e materiais de primeira linha. Após superados os obstáculos iniciais, a atual taxa de sucesso de crescimento das culturas atinge em torno de 98%, uma taxa semelhante aos países desenvolvidos.

Durante estes 13 anos de trabalho, 613 gestações foram diagnosticadas através do cariótipo e dentre estes, 38 foram alterados (6,2%). A tabela 7 especifica os nossos resultados, salientando que as anomalias cromossômicas foram mais frequentes quando malformações fetais eram detectadas na ecografia (60,5% dos casos alterados).

Técnicas moleculares para detecção de cromossomopatias

1. **Fish (Fluorescence *in situ* hybridization):** Esta técnica é o produto da combinação da citogenética tradicional e da biologia molecular, que iniciou na década de 80 em alguns laboratórios selecionados do primeiro mundo, e teve grande aplicabilidade no diagnóstico clínico. Ela permite que sequências de DNA sejam detectadas em metáfases ou em núcleos interfásicos na própria lâmina. Isto é, não há extração de DNA, ele é

Tabela 7: Relação entre a indicação do cariótipo fetal e as alterações cromossômicas identificadas.

Cromossomopatias	Indicação	n (%)
47,—, +21	Malformação na Ecografia	07
	Idade Materna Avançada	06
Total		13 (34.2%)
47,—,+ 18	Malformação na Ecografia	11
	Idade Materna Avançada	02
Total		13 (34.2%)
Translocação Balanceada	Pais com a mesma alteração	05 (13.2%)
Monossomia do X	Higroma cístico, HFNI*	03 (7.9%)
Deleção 4p-	Filho anterior com a mesma	01 (2.6%)
47,XXY	Pai exposto a radiação (?)	01 (2.6%)
47,—,+ marcador	Malformações na ecografia	01 (2.6%)
47,—,+ 13	Malformações na ecografia	01 (2.6%)
		38 (100%)
Total de alterações		

* HFNI- Hidropsia Fetal não imune

estudado diretamente no núcleo ou no cromossomo. Tanto o DNA alvo como a sonda marcada com material fluorescente são denaturados (a dupla hélice abre com o calor). A sonda e o DNA alvo hibridizam. Com um microscópio de fluorescência e filtros adequados se pode visualizar as sequências marcadas e hibridizadas. A grande vantagem desta técnica é que em 24 horas se pode ter o diagnóstico prévio de algumas cromossomopatias, como trissomias do 13, 18 e 21, bem como de cromossomos sexuais. A detecção apenas destas alterações abrange 90% das cromossomopatias. Para as gestantes que normalmente são ansiosas ou de risco, isto é de grande valor;

2. PCR (Polimerase chain reaction): Este também é um método molecular e alternativo para detecção das cromossomopatias mais comuns (13, 18, 21 e cromossomos sexuais), e se baseia em uma técnica amplamente difundida que é a PCR, que com a amplificação de pequenas sequências de DNA (*STRs- polymorphic small tandem repeats*) permite se obter o diagnóstico em algumas horas.

No momento, nenhuma destas técnicas de citogenética molecular está disponível no HCPA para o diagnóstico pré-natal, e sua implantação está em fase de planejamento.

Pesquisa de erros inatos do metabolismo

No grupo dos erros inatos do metabolismo (EIM), onde a maioria das doenças são autossômicas recessivas, a possibilidade de se ter um novo filho afetado é de 25%; já nas situações de herança ligada ao X, há 50% de chance de se ter filhos homens afetados. No momento em que se tem o diagnóstico de uma criança doente, é necessário realizar o aconselhamento genético com a finalidade de informar sobre os riscos de recorrência, o prognóstico e a gravidade da doença em estudo e a possibilidade de realização de DPN. Para os casais em risco, o DPN é uma opção reprodutiva, pois permite o nascimento de crianças normais e ajuda a tranquilizar e a reduzir a ansiedade associada à gestação, principalmente naquelas situações em que o prognóstico é grave e sem a possibilidade de um tratamento eficaz.

O DPN para erros inatos do metabolismo (EIM) é altamente específico, e é realizado de forma acurada naquelas famílias em que o diagnóstico de uma doença metabólica já está bem estabelecido no caso índice (através de estudo bioquímico e/ou molecular), ou nos casos de identificação prévia de um casal de heterozigotos (ou heterozigota de doença ligada ao X). Algumas desordens metabólicas, especialmente as doenças lisossômicas de depósito (DLD), têm sido relacionadas com hidropsia fetal não-imune, ascite fetal e translucência nucal aumentada (32, 33). Nesses casos, também se pode fazer uma investigação pré-natal mas, ao contrário das situações anteriores, onde a investigação é bem específica e direcionada, esta será realizada de forma sistematizada e ampla, na tentativa de averiguar qual destas causas pode estar relacionada com esse tipo de manifestação período pré-natal.

O DPN das doenças metabólicas se tornou realidade na prática médica no final dos anos 60 e início dos anos 70, com o advento da amniocentese e a cultura de células amnióticas, que foi concomitante à descoberta de que os defeitos enzimáticos eram expressados em fibroblastos. Somente 10 anos depois é que se difundiu o uso de vilosidades coriônicas na investigação de doenças metabólicas (33, 34).

Para o DPN de EIM estão disponíveis uma variedade de procedimentos que podem ser realizados em diferentes períodos gestacionais. A BVC é o procedimento de preferência na maioria dos EIM, pois é realizado mais precocemente e permite a análise enzimática, morfológica e/ou molecular, tanto no exame direto deste tecido, como no material cultivado, disponibilizando um resultado inicial para a paciente dentro de 1 a 3 dias após a coleta. Na amniocentese, o líquido amniótico permite uma análise no sobrenadante, onde se pode investigar a presença de metabólitos acumulados e até a atividade de algumas enzimas (dependendo da doença em questão); nas células cultivadas, podem ser realizados ensaios enzimáticos ou pesquisa de mutações por análise molecular. É conveniente salientar que o líquido amniótico fornece resultados provavelmente dentro de 2 a 3 semanas após a coleta. Já a cordocentese geralmente é indicada, no caso dos EIM, em situações que a idade gestacional está bem

avançada na época do DPN. Utiliza-se este material para análise bioquímica, pesquisando a atividade enzimática em plasma ou leucócitos, ou análise molecular. Este procedimento, embora seja realizado em um período mais tardio, a partir da 20ª semana, fornece resultados rápidos por não envolver cultivo de células.

No DPN de doenças metabólicas, a escolha do procedimento adequado para a investigação leva em conta o alto índice de recorrência envolvido nas novas gestações, a idade gestacional no período da avaliação e a doença em risco. Por um lado, o uso de vilosidades coriônicas é preferível por fornecer um resultado mais precoce, permitindo a confirmação caso este seja positivo (35), embora seja descrita uma maior chance de perda fetal e a possibilidade de contaminação com o material materno, fatos que estão diretamente relacionados com a experiência dos profissionais envolvidos (36). Por outro lado, existem doenças como a Mucopolissacaridose tipo I, por exemplo, em que a atividade enzimática da α -iduronidase em vilosidades coriônicas é particularmente baixa, preferindo-se neste caso o uso de líquido amniótico onde a atividade desta enzima é mais elevada (33).

Atualmente, é defendida a realização do DPN da forma mais completa possível a fim de se ter um resultado mais acurado, combinando-se a análise bioquímica (identificação de metabólitos e medida da atividade enzimática) e molecular, através de análise direta da mutação ou estudo de polimorfismos do DNA (33, 37).

Existem situações que merecem cuidados maiores, como é o caso das pseudodeficiências (32, 38), onde há baixa atividade enzimática *in vitro* sem que haja comprometimento clínico. Nestas circunstâncias, é necessário análise de mutações e ensaios enzimáticos não só no caso índice, como também nos pais, antes da realização do DPN.

O Serviço de Genética Médica realiza DPN para DLD desde 1988. É um centro de referência na investigação deste grupo de doenças, uma vez que as DLD contribuem com mais de 50% dos EIM diagnosticados neste serviço, e por disponibilizar a maioria dos ensaios enzimáticos correspondentes ao grupo de DLD até agora descritos.

A tabela 8 mostra o número de DPN realizados, as doenças investigadas e o material

utilizado nos diferentes casos. Naqueles casos investigados pela presença de um filho anterior com doença metabólica foram detectados 16 afetados em 63 estudados, correspondendo a 25,3% dos casos, compatível com o esperado pelo padrão de herança recessivo.

Análise molecular

A análise molecular pode ser útil no DPN de doenças que não apresentem outros meios diagnósticos como síndrome do X-frágil, anemia falciforme e fibrose cística. No caso de doenças em que é possível uma análise bioquímica, como na maioria dos erros inatos do metabolismo por exemplo, a análise molecular pode auxiliar na confirmação do diagnóstico bioquímico, porém dificilmente irá substituí-lo. Ainda assim, em casos em que há suspeita de pseudodeficiência, a análise molecular deve acompanhar a análise

bioquímica. No futuro, a principal aplicação da biologia molecular ao DPN será para a realização de diagnóstico pré-implantação.

A maior dificuldade da aplicação das técnicas de biologia molecular ao diagnóstico pré-natal é a necessidade de conhecimento prévio das mutações presentes na família. Nas doenças em que há uma mutação comum, como fibrose cística, ou as causadas por expansões de trinucleotídeos, é possível estabelecer protocolos de investigação aplicáveis ao DPN. Entretanto, na maioria das doenças genéticas, as mutações são raras e a falta de informação sobre a mutação presente em um ou ambos os pais impede a realização do teste. Mesmo a análise completa do gene no familiar afetado pode não ser suficiente, uma vez que é difícil, especialmente no caso das famílias com mutações privadas, manter um protocolo disponível para a realização

Tabela 8. Diagnósticos pré-natais de EIM realizados no Serviço de Genética Médica entre 1988 e 2001

Doenças	Gestações	Afetados	Material		
			Vilo corial	Líquido amniótico	Sangue fetal
Gangliosidose GM1	26	6	22	4	-
Gangliosidose GM2	10	3	7	2	1
Mucopolissacaridose. I	7	1	4	3	-
Leuc. Metacromática	7	2	7	-	-
D. Gaucher	6		2	3	1
D. Krabbe	2	1	1	1	-
Niemann-Pick B	3	2	1	2	-
Def. Mult. de Sulfatase	1	0	1	-	-
MPS IVA	2	1	-	2	-
MPS IIIB	1	0	-	1	-
Outras indicações					
Hidropsia fetal	19	1	-	15	4
Ascite	1	0	-	1	-
TN aumentada	1	0	-	1	-
Total	86	17	45	35	6

do teste. Uma alternativa nestes casos é a realização de testes indiretos, utilizando análise de ligação através de análise de marcadores intragênicos ou próximos ao gene em questão. No entanto, estes testes, apesar de generalizáveis para a maioria dos pacientes, apresentam resultados que indicam apenas a probabilidade de o feto ter ou não herdado a doença, ao contrário dos testes diretos que fornecem resultados de certeza.

Outra alternativa é o estabelecimento de testes completos para um número reduzido de doenças, preferencialmente aquelas na qual o laboratório tem maior experiência, constituindo-se assim em um centro de referência para estas enfermidades.

O Laboratório de Biologia Molecular do SGM-HCPA tem realizado análise molecular em pacientes com diferentes erros inatos do metabolismo, e dos 4 testes pré-natais feitos desde 1996, um foi para Mucopolissacaridose tipo I, dois para Mucopolissacaridose tipo II e um para Gangliosidose GM1 (Leistner, 2001 – comunicação pessoal). No entanto, já há disponibilidade técnica para a realização de um número maior de exames para outras doenças genéticas.

Conclusões

Aspectos éticos

A discussão dos aspectos éticos do DPN passa, inevitavelmente, pela questão das atitudes a serem tomadas frente a um resultado anormal. Em vários países, é legalmente permitido terminar a gestação de fetos afetados por doenças genéticas graves. No Brasil, a interrupção da gestação por este motivo não é permitida por lei, apesar de serem cada vez mais frequentes liminares judiciais permitindo a interrupção da gestação no caso de malformações graves. Paradoxalmente, apesar de toda a discussão em relação à possibilidade de interrupção da gestação, o fato é que o DPN tem contribuído significativamente para a diminuição dos abortos em famílias de risco, já que a maioria dos testes diagnóstica fetos normais (39). Assim, existem menos abortos de fetos não afetados e mais crianças desejadas estão nascendo de casais em risco (40).

O dilema entre permitir ou não a interrupção

da gestação de um feto afetado depende de considerações sobre o *status* moral do feto, crenças religiosas, posição quanto ao valor absoluto da vida e avaliação da qualidade de vida dos indivíduos afetados pela doença em questão. Quanto a este último ponto, é preciso ressaltar que o conceito de qualidade de vida é extremamente variável e está ligado à capacidade de suporte social para manter a criança. Por outro lado, é preciso garantir que o fato de se poder evitar o nascimento de crianças com alguma deficiência não influencie a posição da sociedade frente a indivíduos deficientes, incluindo a capacidade da aceitação de diferenças (41). Da mesma forma, não deve haver pressão social sobre as decisões tomadas pelo casal, tanto no sentido de interromper como no de continuar a gestação de um feto afetado.

Deve haver um balanço no sentido de que as mulheres tenham informação suficiente sobre o serviço mas não se sintam pressionadas a utilizá-lo, pois assim como pode trazer esclarecimentos importantes para o casal, o DPN também pode ser motivo de grande ansiedade (42). Da mesma forma, deve-se evitar a realização de procedimentos sem uma indicação consistente, motivados apenas por ansiedade materna. O surgimento de exames menos invasivos, e por isso oferecidos quase como rotina a um maior número de gestantes, como o triplo teste fetal e a medida da translucência nugal, faz com que um grande número de pessoas sejam testadas apenas para se assegurarem que terão uma gestação normal (41). Entretanto, há o risco de que essas pessoas não estejam recebendo um aconselhamento genético adequado prévio à realização do teste, tornando difícil lidar com um eventual resultado alterado. Isso ocorre mesmo em casais em risco para uma doença genética, especialmente porque cerca de 95% dos resultados são normais. Por este motivo, o aconselhamento genético prévio a todos os testes pré-natais deveria incluir uma descrição do pior cenário, para que os pacientes, uma vez informados de todas as possibilidades e implicações tenham condições de decidir se querem ou não realizar os testes (41).

Em resumo, a realização do DPN acompanhado de aconselhamento genético adequado e garantido o suporte dos profissionais de saúde à decisão do casal é eticamente aceitável,

ainda que possa gerar dilemas éticos. Outros princípios, comuns aos testes genéticos em geral, são também aplicáveis como o respeito à autonomia dos pacientes, previsto no caráter voluntário da realização dos testes e o respeito às decisões do casal, além de garantias quanto à confidencialidade das informações (43). Além disso, é importante ressaltar que as decisões éticas e morais devem ser tomadas pela família e nunca impostas pelo médico ou pela sociedade (44).

Perspectivas para o futuro

Diagnóstico genético pré-implantação

O diagnóstico genético pré-implantação (DPI) é uma forma de diagnóstico pré-natal, combinando técnicas de fertilização *in vitro* e biologia molecular, onde as células de cada embrião são examinadas para a detecção da presença ou não de uma desordem genética antes da transferência embrionária e da ocorrência da gestação. A retirada de células para a análise pode ser realizada em diversas etapas embrionárias, como oócitos, embriões de 8 células ou blastocistos, e é realizada através de uma biópsia muito cuidadosa. FISH e PCR são as técnicas utilizadas na análise genética, sendo que a primeira é utilizada para determinar doenças cromossômicas e a última para detecção de doenças gênicas. Ambas as técnicas foram modificadas para serem aplicadas em uma célula única com eficácia e acurácia bastante aumentadas. As células saudáveis são transferidas novamente para o útero materno. A aplicabilidade do DPI ainda é limitada em todo o mundo, devido às dificuldades técnicas envolvidas

Terapia fetal

O desenvolvimento de métodos para diagnóstico pré-natal foi de real importância no aconselhamento genético de gestações de risco. Apesar disto, atualmente, não se pode oferecer muito ao feto, a não ser um atendimento especializado e preparado para alguma urgência ao seu nascimento. Para a família também não há muito a oferecer, exceto o abortamento de uma gestação anormal.

Entretanto, há um esforço científico em busca de tratamentos intra-útero, que junto à grande capacidade de regeneração do tecido fetal, poderá ser uma revolução. Atualmente, já

existe tratamento com sucesso para arritmias cardíacas, através da administração de fármacos antiarrítmicos (como a digoxina) para a mãe, que atingem o feto por via transplacentária (45, 46). Outros tratamentos que estão em estudo são a administração de dexametasona para a gestante para terapia de hiperplasia adrenal congênita (47), o transplante intra-útero de células tronco hematopoiéticas (*stem cells*) para o tratamento de síndromes de imunodeficiência e b-talassemias (48), que já demonstrou resultados positivos.

Um procedimento que esteve muito em moda e que os estudos demonstraram que não havia uma boa sobrevida fetal, foram as cirurgias fetais a céu-aberto para correção de defeitos congênitos, como meningomielocelo, hérnia diafragmática, teratoma sacrococcígeo e obstruções urinárias. A maior complicação destes procedimentos é a alta taxa de partos prematuros. A principal novidade neste campo são os estudos em animais de cirurgia endoscópica, que parecem diminuir muito o risco de indução de parto e o estresse fetal cirúrgico. A principal terapia cirúrgica realizada atualmente é a coagulação a *laser* de vasos da placenta em gestações gemelares com a síndrome de transfusão feto-fetal, com taxas de sobrevida em torno de 55% (49).

A experiência no HCPA é limitada ao tratamento das arritmias cardíacas. Outros procedimentos devem ter sua eficácia e segurança comprovadas antes da aplicação clínica.

Terapia gênica

A terapia gênica surgiu no início da década de 90 como uma proposta de cura de doenças genéticas. Muitas pesquisas ainda deverão ocorrer até que os protocolos estejam disponíveis para aplicação em grande escala. No futuro, se pode prever que a identificação pré-natal de uma doença genética permitirá seu tratamento por terapia gênica logo após o nascimento, antes que os sintomas clínicos se manifestem ou agravem e antes que ocorram lesões irreversíveis. Entretanto, não se pode prever o tratamento ou a prevenção de manifestações que ocorrem intra-útero, uma vez que protocolos de terapia gênica intra-uterina são considerados inaceitáveis do ponto de vista ético pelo risco de transferência gênica para as células germinativas.

O diagnóstico pré-natal é um importante recurso para as famílias com risco de anomalia fetal, permitindo a opção pelo nascimento de uma criança normal. O HCPA já oferece grande parte das técnicas atualmente disponíveis para DPN, dentro de um programa multidisciplinar de Diagnóstico Pré-natal, vinculado ao Grupo de Medicina Fetal do HCPA.

Novas técnicas estão em fase de implantação, como a citogenética molecular. Perspectivas interessantes, como o diagnóstico pré-implantação e a terapia gênica, estão em fase de estudos, e poderão contribuir ainda mais para o atendimento dessas famílias.

Referências

- Milunsky A, Milunsky J. Genetic Counseling: Preconception, Prenatal, and Perinatal. In: Milunsky A, editor. *Genetic Disorders and The Fetus*. 4th ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press; 1998. p.1-52.
- Pyeritz RE. Medical Diagnosis. In: Tierney Jr. LM, McPhee SJ, Papadakis MA, editors. *Current Medical Diagnosis & Treatment*. 39th ed. New York; 2000. p. 1574-97.
- Harper PS. *Practical Genetic Counselling*, 3rd ed. Londres: Ed. Wrigt; 1988.
- Rubin SP, Malin J, Maidman J. Genetic Counseling before prenatal diagnosis for advanced maternal age: An important medical safeguard. *Obstet Gynecol* 62:155. In: *Genetic Disorders and The Fetus*. The Johns Hopkins University Press, 4th ed. 1998, p.1-52.
- Medical Research Council Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of medical research council vitamin study. *Lancet* 1991;228:131.
- Waurin J. Genetic Counseling: Prenatal Counseling of an Abnormal Finding. *The Journal of the Association of Genetic Technologists* 1998; 24(3):81-3.
- Grobstein R. Amniocentesis counseling. In: Kessler S, editor. *Genetics counseling: psychological dimensions*. New York: Academic Press; 1979. p.107-13.
- American College of Medical Genetics. Statement on multiple marker screening in pregnant women. *Newsletter* 1994;2.
- Haddow JE, Kloza EM, Smith, DE, Knight GJ. Data from an alpha-protein pilot screening program in Maine. *Obstet Gynecol* 1983;62:556-60.
- Mercatz IR, Nitowsky HM, Maeri JN, Johnson WE. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:886-94.
- Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. Estimating a woman risk of having a pregnancy associate with Down's Syndrome using her age and serum alpha fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:387-402.12.
- Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancy program in Maine. *Obstet Gynecol* 1987;62:556-60.13.
- Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Nanchahal K, Royston P, Chard T, et al. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *BMJ* 1988;297:883-7.
- Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, Williams J, Miller WA, Johnson A. Screening of maternal serum for fetal Down's Syndrome in the first trimester. *N Engl J Med* 1998;338:955-61.
- Cuckle H. Calculating correct Down's syndrome risks. *Br J Obst Gynaecol* 1999;106: 371-2.
- Maestri D, Sanseverino MTV, Cheinquer MCM, Kessler RG, Magalhães JAA. Alfafetoproteína: valores normais no líquido amniótico entre 14 e 21 semanas. *Rev Ass Med Brasil* 1988;44(4):273-6.
- Fonseca MMC, Magalhães JAA, Papich H, Dias R, Schmidt A. Ultra-sonografia em obstetrícia: explorando um mundo novo. A relação pais-bebê – da observação à clínica. In: Caron NA, editor. São Paulo: Casa do Psicólogo; 2000.
- Nicolaidis KH, Azar G, Byrne D, et al. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening defects in first trimester of pregnancy. *Br Med J* 1992;304:867-9.
- Souka AP, Krampfl S, Bakalis V, Heath V, Nicolaidis KH. Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal tranlucency in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 18:9-17.
- Hippala A, Eronen M, Taipale P, Salonen R, Hilesmaa V. Fetal nuchal translucency and normal chromosomes: a long-term follow-up study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;18:18-22.
- Fesslova V, Nava S, Villa L. Evolution and long term outcome in cases with fetal diagnosis of congenital heart disease: Italian multicenter study. *Fetal Cardiology Study Group of the Italian Society of Pediatric Cardiology. Heart* 1999;82(5):594.
- Simpson JM, Milburn A, Yates RW, et al. Outcome

- of intermittent tachyarrhythmias in the fetus. *Pediatric Cardiology* 1997;18:78.
23. Copel JA, Pilu G, Green J, et al. Fetal echocardiographic screening for congenital heart disease: the importance of the four chamber view. *American Journal of Obstetrics Gynecology* 1987;157:648.
 24. Allan LD, Sharland G, Cook. *Atlas colorido de Cardiologia fetal*. Livraria e editora Revinter Ltda para língua portuguesa; 1997.
 25. Rabih C. Screening for fetal heart defects. *Diploma in Fetal Medicine*. The Fetal Medicine Foundation. Nicolaidis K, Romero R, Ville Y. 1999.
 26. Rabih C. Color Doppler sonography in the assesment of the fetal heart. *Diploma in Fetal Medicine*. The Fetal Medicine Foundation. Nicolaidis K, Romero R, Ville Y. 1999, 12:17.
 27. Achiron R, Glaser J, Gelener I, et al. Extended fetal echocardiography examination for detecting cardiac malformations in low-risk pregnancies. *British Medical Journal* 1992;11:345.
 28. Abuhamad A. *A practical guide to fetal echocardiography*. New York: Lippincott-Raven;1997.
 29. Kalter H, Warkany. Congenital malformations. *N Engl J Med* 1983;308:424-31/491-7.
 30. Alberman ED, Creasy MR. Frequency of chromosomal abnormalities in miscarriages and perinatal deaths. *J Med Genet* 1977;14:313.
 31. Wilson RD. Early amniocentesis: a clinical review. *Pren Diagn* 1995;15:1259-73.
 32. Gilan JE, Lowden JA, Gaskin K, Cutz E. Congenital ascites as a presenting sign of lysosomal storage disease. *J Pediatr* 1984;104(2):225-31.
 33. Lake BD, Young EP, Winchester BG. Prenatal diagnosis of lysosomal storage diseases. *Brain Pathol* 1998;8:133-49.
 34. Mathieu M. Prenatal diagnosis of genetic diseases in France. *Ann Pharm Fr* 1999; 57(5):380-4.
 35. Poenaru L., Belon JP, Besancon AM, Dreyfus JC. Early prenatal diagnosis of lysosomal enzymopathies from biopsies of trophoblasts. *Ann Med Interne (Paris)* 1985;136(5):409-11.
 36. Besley GTN, Young E, Fensom AH, Cooper A. First trimester diagnosis of inherited metabolic disease: experience in UK. *J Inher Met Dis* 1991;14:129-33.
 37. Kamoun PP, Chadefaux B. Eleventh week amniocentesis for prenatal diagnosis of some metabolic diseases. *Prenat Diag* 1991;11(9):691-6.
 38. Thomaz GH. Pseudodeficiencies of lysosomal hydrolases. *Am J Hum Gen* 1994;54:934-40.
 39. Zatz, M. Dilemas éticos do mapeamento genético. *Revista USP* 1994;24:20-7.
 40. Fletcher JC, Evans M. Ethics in Reproductive Genetics *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1992; 35(4):763-782.
 41. British Medical Association. *Human Genetics: choice and responsibility*. Oxford: Oxford University Press; 1998.
 42. National Institute of Health Workshop Statement. Reproductive genetic testing: impact on women. *American Journal of Human Genetics* 1992;51:1161-3.
 43. Johnson S, Elkins TE. Ethical issues in prenatal diagnosis clinical obstetrics and gynecology 1988;31(2):408-17.
 44. Annas GJ, Elias S. Legal and Ethical Implications of Fetal Diagnosis and Gene Therapy. *American Journal of Medical Genetics* 1990;35:215-8.
 45. Brackley KJ, Ismail KM, Wright JG, Kilby MD. The resolution of fetal hydrops using combined maternal digoxin and dexamethasone therapy in a case of isolated complete heart block at 30 weeks gestation. *Fetal Diagn Ther* 2000;15(6):355-8.
 46. Won HS, Lee IS, Yoo HK, Yoo SJ, Ko JK, Lee PR, et al. Two cases of atrial flutter with fetal hydrops: successful fetal drug therapy. *J Korean Med Sci* 1998;13(6):676-9.
 47. Miller WL. Dexamethasone treatment of congenital adrenal hyperplasia in utero: an experimental therapy of unproven safety. *J Urol* 1999;162(2):537-40.
 48. Pschera H. Stem cells therapy in utero. *J Perinat Med* 2000;28(5):346-54.
 49. Deprest JA, Lerut TE, Vandenberghe K. Operative fetoscopy: new perspective in fetal therapy? *Prenat Diagn* 1997;17(13):1247-60.

Transjugular liver biopsy: experience with the trucut needle

Antonio C. Maciel¹, Edson Marchiori², Sérgio G. S. Barros³, Carlos T. S. Cerski³, Dorvaldo P. Tarasconi¹, Darcy O. Ilha¹

OBJECTIVES: We describe the use of transjugular liver biopsy with the automated trucut needle and emphasize the benefits of this procedure in patients with cirrhosis and fibrosis.

METHODS: Puncture of the right or left internal jugular vein was performed. A needle was advanced into the right hepatic vein through guides and catheters. Biopsies were obtained from the right liver lobe. Thirty-six transjugular biopsies were performed in 35 patients with clinical diagnosis of hepatopathy; all patients presented contraindication to the standard percutaneous liver biopsy.

RESULTS: Out of 36 transjugular liver biopsies, one patient had to repeat the procedure because the initial specimen did not allow diagnosis. In two patients, it was not possible to complete the biopsy due to inability to advance the needle into the right hepatic vein and due to the occurrence of extrasystole; in these cases, the procedure was discontinued. Biopsy was successfully performed in 34 patients (94%), and a conclusive diagnosis was obtained in 32 (89%). There were no relevant complications.

CONCLUSIONS: Transjugular liver biopsy allowed histopathological diagnosis in a group of patients presenting contraindications to the standard percutaneous technique. With the trucut needle, it was possible to obtain large, nonfragmented specimens, even in patients with cirrhosis and fibrosis.

Key-words: Liver; needles; biopsy needle; transjugular liver biopsy.

Transjugular liver biopsy: experience with the trucut needle

OBJETIVOS: O estudo descreve o uso de biópsia hepática transjugular com a agulha trucut automatizada e salienta os benefícios deste procedimento em pacientes com cirrose e fibrose hepática.

Métodos: Foi realizada punção da veia jugular interna direita ou esquerda. Através de fio guia e cateteres, uma agulha foi introduzida na veia hepática direita. As biópsias foram realizadas no lobo direito do fígado. Trinta e seis biópsias hepáticas transjugulares foram realizadas em 35 pacientes com diagnóstico clínico de hepatopatia; todos os pacientes apresentavam contra-indicação à biópsia hepática percutânea.

RESULTADOS: Das 36 biópsias hepáticas transjugulares, um paciente precisou repetir o procedimento porque a amostra inicial não permitiu um diagnóstico conclusivo. Em

¹ Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre; Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondence: Dr. Antonio Carlos Maciel, Avenida Bagé 1244/401, CEP 90460-080, Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55-51-3331-5792, e-mail: mathmac@bol.com.br

² Universidade Federal do Rio de Janeiro; Universidade Federal Fluminense.

³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

dois pacientes, não foi possível completar a biópsia devido à impossibilidade de passar a agulha para a veia hepática direita e devido à ocorrência de extra-sístole; os procedimentos foram suspensos em ambos os casos. A biópsia foi efetuada com sucesso em 34 pacientes (94%), e um diagnóstico conclusivo foi obtido em 32 (89%). Não tivemos nenhuma complicação relevante.

CONCLUSÕES: A biópsia hepática transjugular permitiu o diagnóstico histopatológico em um grupo de pacientes que apresentava contra-indicação à biópsia hepática percutânea. Com a agulha trucut, foi possível obter amostras maiores, não fragmentadas, mesmo em pacientes com cirrose e fibrose.

Unitermos: Fígado; agulhas; biópsia por agulha; biópsia hepática transjugular.

Revista HCPA 2001(3):317-320

Introduction

Liver biopsy is a very important method in the investigation of hepatopathies, and it has an essential role in the diagnosis of liver disease. Through liver biopsy, it is possible to determine liver activity and the staging of disorders, and the technique also serves to guide treatment decisions and to assess treatment efficacy (1,2). These considerations have led several authors to develop different techniques for liver biopsy (3-7). The choice of the most adequate method will depend on the patient's conditions and on the availability of material and personnel.

The use of transjugular liver biopsy is limited to certain indications, although in general the indications for transjugular liver biopsy are the same as for percutaneous liver biopsy (8). Thus, the transjugular liver biopsy becomes an important alternative whenever the standard technique poses risks for the patient; the main contraindications for the percutaneous liver biopsy are coagulation disorders and massive ascites.

The first transjugular liver biopsies were performed experimentally in 1964 by Charles Dotter (9). Many aspects of the procedure have evolved since its initial description, especially in terms of adequacy of specimens for histopathological study (3,10-14). The trucut needle was introduced with the aim of obtaining larger specimens (10,12) and avoiding the excessive fragmentation found in aspiration biopsies (4,10), so the efficacy of this method and the quality of specimens yielded may be compared to those obtained with percutaneous liver biopsy using the trucut needle.

The objective of this work was to show our experience and the results we found with the performance of transjugular liver biopsies using the automated trucut needle in a group of patients presenting hepatopathies.

Materials and methods

The present study was carried out at Hospital São José (Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre) in the city of Porto Alegre, Brazil, with all adult patients submitted to transjugular liver biopsy between August 1997 and April 2001. A total of 36 transjugular liver biopsies were performed in 35 patients during this period. Of these patients, 20 (57%) were males and 15 (43%) were females; age ranged from 18 to 73 years.

All the patients were submitted to the same protocol, remained hospitalized for a minimum of 12 hours after the procedure, and signed an informed consent form. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the hospital.

Biopsy consisted of puncture of the right internal jugular vein (IJV); in two cases, the left vein was used. Guides, catheters, and needle were advanced into the right hepatic vein (RHV). All specimens were analyzed by the same pathologist (CTSC) at a teaching hospital in the city of Porto Alegre (Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

Results

From the 36 transjugular liver biopsies performed with the automated trucut needle in 35 patients, one had to repeat the procedure because the initial specimen presented only one

portal triad and therefore did not allow a conclusive diagnosis to be reached. In two patients, it was not possible to advance the needle into the RHV, and extrasystole occurred; the procedures were discontinued in both cases. Thus, biopsy was completed in 34 patients (94%).

Diagnosis was possible in 32 patients (89%). In the two cases that did not allow diagnosis, the reasons were inadequate specimen (only one portal triad) and absence of liver tissue (the specimen was obtained from the wall of the RHV). Specimen length ranged from 0.2 to 2.0 cm (mean = 1.2 cm). The number of portal triads ranged from 1 to 21 (mean = 8.8).

There were no severe complications in our group. Two patients presented extrasystole during the procedure, which was reverted as soon as the catheter and the guide were removed. Three patients presented capsular perforation and one presented collection of contrast medium in the liver parenchyma; however, symptoms were no longer present after the procedure. One patient developed a hematoma in the liver parenchyma; this patient presented mild abdominal pain until the following day.

Discussion

Most studies about transjugular liver biopsy have been carried out with the conventional aspiration technique, using the modified Ross or the Colapinto needles, and the samples have usually been small (10). According to Gilmore et al. (12), the transjugular liver biopsy with aspiration needles has not been widely adopted because the procedure is considered technically difficult and because the specimens are usually smaller and more fragmented when compared to those obtained percutaneously with the trucut needle, especially in patients with fibrosis and cirrhosis (4,10,12,15). This needle was first advocated by Gilmore et al. (12), and consisted of the association between a modified Vim-Silverman's needle (trucut) and a 50-cm long flexible coaxial cable (used in endoscopic forceps biopsies), which allowed proximal operation.

Some time later, with the association of the trucut needle with an automated system for transjugular liver biopsy, important advantages were incorporated. Specimens were larger and less fragmented, which increased the possibility of obtaining histopathological diagnosis (16).

Parker et al. (17), Bernardino (18), and Hopper et al. (19) mentioned that when using the automated needle system, a single biopsy may be sufficient to obtain an adequate specimen, thus reducing the duration of the procedure. Specific training is not required, as it is required in the case of tissue aspiration. In addition, the authors believe that the movements performed during aspiration may cause trauma and complications. In turn, transjugular liver biopsy with the trucut needle yields better-quality and more uniform samples, due to the standardized movement of the needle. The authors also mention that specimens obtained with this method contain less blood, differently from those obtained with the aspiration technique (17-19).

Colombo et al. (20) compared the diagnostic results of percutaneous liver biopsy performed with the trucut and the Menghini needles in 1,192 patients presenting diffuse hepatic disease. The authors obtained adequate specimens in 94% of the cases in which the trucut needle had been used and in 79.2% of the cases in which the Menghini needle had been used ($P < 0.0001$). A diagnostic accuracy of 89.5% was obtained in cases of cirrhosis when using the trucut needle; with the Menghini needle, this value was 65.5% ($P < 0.05$).

Sada et al. (21) performed 65 transjugular liver biopsies in 67 patients. Thirty-four patients underwent the aspiration technique, and 31 underwent the trucut needle system. Specimens obtained with aspiration biopsy were smaller and more fragmented. Although the authors do not specifically mention the length of the specimens, they report that those obtained with the trucut needle were significantly larger.

De Hoyos et al. (22) performed transjugular liver biopsy with the trucut needle in 52 patients and reported a 94.2% success rate (49 patients), with no fragmentation of specimens, even in cases of patients with cirrhosis or fibrosis.

In our study, the length of liver specimens of patients with and without cirrhosis did not present a statistically significant difference ($p = 0.516$). So, the tendency of liver biopsy specimens to be small or fragmented, especially in cases of fibrosis or cirrhosis, was eliminated with the use of the trucut needle (20,21).

We agree with Lebrec et al. (23) in that transjugular liver biopsy is a very important procedure in hepatology departments. It is more

complex than the percutaneous liver biopsy. However, the radiologists involved in this technique do not consider the method very complex (24).

Although percutaneous liver biopsy is likely to remain as the standard method for liver biopsies, transjugular liver biopsy with the trucut needle offers a specific group of patients the possibility of establishing diagnosis and choosing the most adequate treatment.

Acknowledgements

We are grateful for the editorial support provided by the Graduate Research Group at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

References

- Gamble P, Colapinto RF, Stronell RD, Colman JC, Blendis L. Transjugular liver biopsy: a review of 461 biopsies. *Radiology* 1985;157:589-93.
- Kardache M, Soyer P, Boudiaf M, Cochand-Priollet B, Pelage J-P, Rymer R. Transjugular liver biopsy with an automated device. *Radiology* 1997;204:369-72.
- Colapinto RF, Blendis LM. Liver biopsy through the transjugular approach. Modification of instruments. *Radiology* 1983;148(1):306.
- Gilmore IT, Bradley RD, Thompson RPH. Transjugular liver biopsy. *Br Med J* 1977;2(6079):100-1.
- Menghini G. One-second needle biopsy of the liver. *Gastroenterology* 1958;35:190-9.
- Rosch J, Lakin P, Antonovic R, Dotter CT. Transjugular liver biopsy and cholangiography. *Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed* 1973;119(6):653-61.
- Rosch J, Antonovic R, Dotter CT. Transjugular approach to the liver, biliary system, and portal circulation. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1975;125(3):602-8.
- Zwiebel FM, Holl J, Kleber G. Transjugulare leberpunktion. *Bildgebung* 1993;60:161-8.
- Dotter CT. Catheter biopsy. Experimental technique for transvenous liver biopsy. *Radiology* 1964;82:312-4.
- Bull HJM, Gilmore IT, Bradley RD, Marigold JH, Thompson RPH. Experience with transjugular liver biopsy. *Gut* 1983;24:1057-60.
- Colapinto RF. Transjugular biopsy of the liver. *Clin Gastroenterol* 1985;14:451-67.
- Gilmore IT, Bradley RD, Thompson RPH. Improved method of transvenous liver biopsy. *Br Med J* 1978;2(6132):249-50.
- Henriksen JH, Matzen P, Christoffersen P, Juhl E, Winkler K. Improved transvenous liver biopsy needle. *Scand J Gastroenterol* 1979;14:593-8.
- Trerotola SO, Venbrux AC, Osterman Jr FA. Use of a guard wire during transjugular liver biopsy with the Colapinto needle. *J Vasc Interv Radiol* 1991;2:563-4.
- Lebrec D, Goldfarb G, Degott C, Rueff B, Benhamou J-P. Transvenous liver biopsy. An experience based on 1000 hepatic tissue samplings with this procedure. *Gastroenterology* 1982;83:338-40.
- Gonzalez-Tutor A, Garcia-Valtuille R, Cerezal L, Bustamante M. Transjugular biopsy of the liver with an automated device. *Acta Radiologica* 1998;39:686-9.
- Parker SH, Hopper KD, Yakes WF, Gibson MD, Ownbey JL, Carter TE. Image-directed percutaneous biopsies with a biopsy gun. *Radiology* 1989;171:663-9.
- Bernardino ME. Automated biopsy devices: significance and safety. *Radiology* 1990;176:615-6.
- Hopper KD, Abendroth CS, Sturtz KW, Matthews YL, Shirk SJ, Stevens LA. Blinded comparison of biopsy needles and automated devices in vitro: 1. Biopsy of diffuse hepatic disease. *AJR* 1993; 161:1293-7.
- Colombo M, Del Ninno E, De Franchis R, De Fazio C, Festorazzi S, Ronchi G, et al. Ultrasound-assisted percutaneous liver biopsy: superiority of the tru-cut over the Menghini needle for diagnosis of cirrhosis. *Gastroenterology* 1988;95:487-9.
- Sada PN, Ramakrishna B, Thomas CP, Govil S, Koshi T, Chandy G. Transjugular liver biopsy: a comparison of aspiration and trucut techniques. *Liver* 1997;17(5):257-9.
- De Hoyos A, Loredó ML, Martínez-Ríos MA, Gil MR, Kuri J, Cárdenas M. Transjugular liver biopsy in 52 patients with an automated trucut-type needle. *Dig Dis Sci* 1999;44(1):177-80.
- Lebrec D. Various approaches to obtaining liver tissue – choosing the biopsy technique. *J Hepatol* 1996;25:20-4.
- Steadman C, Teague C, Harper J, Hayes P, Nathan N, Harris O, et al. Transjugular liver biopsy - an Australian experience. *Aust N Z J Med* 1988;18:836-40.

Protocolos laboratoriais de análise molecular para investigação de doenças genéticas

Maria L. S. Pereira¹, Sandra Leistner²,
Úrsula Matte²

A aplicação da análise molecular na investigação de doenças genéticas começou a ser utilizada como avaliação rotineira em laboratórios no decorrer da última década. Mais recentemente, a identificação de mutações específicas responsáveis por doenças hereditárias tornou o diagnóstico molecular mais rápido e eficaz, fazendo desta análise uma ótima ferramenta para diagnóstico de muitas destas doenças. Diversas técnicas laboratoriais são utilizadas para a análise molecular de doenças genéticas. Dentre estas destaca-se a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), que foi um marco na "era molecular". Nos últimos anos, os procedimentos vem sendo automatizados gradativamente, o que irá propiciar a realização de maior número de testes num curto espaço de tempo. O uso dos conhecimentos da Biologia Molecular vem sendo aplicado nas mais variadas áreas da Medicina. No campo da genética molecular, os avanços das últimas décadas demonstram um enorme potencial desta tecnologia, que pode ser utilizada não somente no diagnóstico mas também no tratamento e prevenção de doenças hereditárias. As perspectivas para o novo século são bastante promissoras e indicam a possibilidade de grandes avanços no tratamento de doenças. O presente artigo descreve as principais técnicas de análise molecular utilizadas para a investigação de doenças genéticas.

Unitermos: Doenças genéticas; análise molecular; PCR.

Laboratory protocols of molecular analysis for the investigation of genetic diseases

The application of molecular analysis in the investigation of genetic diseases has been used as routine evaluation in laboratories worldwide in the last decade. More recently, the identification of specific mutations responsible for hereditary disorders made molecular diagnosis quicker and more efficient, making this analysis an excellent tool for the diagnosis of many diseases. Several techniques can be used and, among them, the Polymerase Chain Reaction (PCR) was a mark in the "molecular era". In the last few years, the procedures have been automated gradually, which will allow the realization of a greater number of tests in a limited amount of time. The use of knowledge in Molecular Biology Techniques has been applied in many fields of Medicine. The advances

¹ Laboratório de Genética Molecular, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Correspondência: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: mpereira@hcpa.ufrgs.br

² Laboratório de Genética Molecular, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

made in the last decade demonstrate a huge potential of these technologies, which can be used not only for diagnosis, but also for treatment and prevention of hereditary disorders. The perspectives for the new century are very promising and indicate the possibility of great advances in the treatment of genetic diseases. The present article describes the main techniques used in the molecular analysis for the investigation of genetic diseases.

Key-words: Genetic diseases; molecular analysis; PCR

Revista HCPA 2001(3):321-328

Introdução

A aplicação da análise molecular na investigação de doenças genéticas começou a ser utilizada como avaliação rotineira em laboratórios no decorrer da última década. Neste período, a utilização da chamada "análise de DNA" tornou-se popular, não apenas no hemisfério norte, mas também em laboratórios localizados nos chamados países em desenvolvimento. Inicialmente, a conhecida "análise de DNA" estava limitada a análises de ligação e detecção de deleções e era utilizada, principalmente, para aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal. Mais recentemente, a identificação de mutações específicas responsáveis por doenças hereditárias tornou o diagnóstico molecular mais rápido e eficaz, fazendo desta análise uma ótima ferramenta para diagnóstico de muitas destas doenças.

Um marco essencial para a aplicação dos fundamentos de biologia molecular na rotina laboratorial foi o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), no final dos anos 80, utilizada atualmente para identificação de mutações e/ou polimorfismos presentes nos pacientes. Os protocolos de detecção, inicialmente desenvolvidos para realização manual, vêm sendo automatizados gradativamente, o que poderá agilizar os resultados e oferecer subsídios de suporte ao médico num curto período de tempo.

As doenças genéticas são causadas por alterações (mutações e/ou polimorfismos) no DNA, que podem ser identificadas por protocolos laboratoriais de análise molecular. Abordaremos abaixo os tipos de mutações associadas com doenças genéticas e as técnicas laboratoriais mais freqüentemente utilizadas para detectar

alguma alteração na seqüência normal de um gene.

Mutações

Uma mutação é simplesmente uma mudança na estrutura primária do DNA, que consiste de uma seqüência linear de pares de nucleotídeos, representando a informação química armazenada. O efeito que uma mutação tem no fenótipo de um organismo varia do "trivial" ao "letal", dependendo da propriedade da proteína codificada pelo gene alterado e como aquela alteração afeta o desenvolvimento e a manutenção do nosso corpo.

Muitas mutações produzem efeitos fenotípicos que têm conseqüências tais como cor diferente de cabelo e que são chamadas mutações não causadoras de doença (ou polimorfismos), enquanto outras podem ter conseqüências mais graves tais como aquelas que levam a doenças como Huntington e hemofilia, e que são denominadas mutações causadoras de doença.

As mutações podem ser germinativas, quando ocorrem em células germinais que são aquelas destinadas a se tornarem ovo ou esperma. Estas mutações não afetam as pessoas nas quais ocorrem mas podem ser transmitidas e causar danos em futuras gerações. As mutações somáticas, por outro lado, ocorrem em células do corpo (fígado, pulmão, intestino, etc) e podem afetar o fenótipo do seu portador, mas não são transmitidas para os seus descendentes. Esta classe de mutações são as mais envolvidas no desenvolvimento do câncer.

Sejam germinativas ou somáticas, em nível molecular as alterações genéticas podem ser:

Mutações de ponto ou substituição de bases

1. *Missense* (ou de sentido trocado): aqui existe a troca de um nucleotídeo por outro, ocasionando também a troca de um aminoácido. Cerca de 73% das substituições de base nas regiões codificantes dos genes são mutações *missense*. Pode ocorrer, também, a troca de um nucleotídeo sem alteração do aminoácido. Neste caso, a mutação é chamada silenciosa e não tem consequência fenotípica;

2. *Nonsense* (ou sem sentido): troca de um nucleotídeo por outro, ocasionando a troca de um aminoácido por um códon de parada. Têm o efeito de parar a tradução da proteína prematuramente, produzindo um polipeptídeo mais curto, muitas vezes chamado de proteína truncada. Em torno de 4% das substituições de base são do tipo *nonsense*;

3. *Splicing* (mutações em sítio de processamento de RNA): são mutações de ponto presentes nas junções entre íntron e éxon. Alteram o processamento do RNA de modo que as regiões correspondentes aos íntrons não são retiradas da molécula de maneira apropriada. Na maioria dos casos, ocorre a utilização de um sítio de *splicing* alternativo que pode estar localizado dentro do próprio éxon ou em um íntron anterior ou subsequente;

4. *Inserções*: podem ser pequenas, isto é, inserção de um ou mais pares de base, podendo ser também definidas como mutações *frameshift* ou mutações de mudança do quadro de leitura. Estas não apenas alteram o códon onde ocorrem como também mudam o quadro de leitura (*reading frame*), fazendo com que as unidades codificantes (códon ou conjunto de três letras que formam um aminoácido) sejam modificados daquele ponto em diante. Quando isto ocorre, geralmente há a formação de um códon de parada prematuro, causando um efeito similar ao das mutações *nonsense*. Alternativamente, elas podem não modificar o quadro de leitura, se a inserção for de três pares de bases, ocasionando a introdução de um novo aminoácido na proteína mutante;

5. *Deleções*: também podem ser pequenas ou grandes deleções. As pequenas deleções (um ou mais pares de bases) também podem causar *frameshift* (mutações de mudança do quadro de leitura) ou não alterar o quadro de leitura da proteína (se for uma deleção de três pares de bases). As grandes deleções podem causar a retirada de 1 ou mais éxons ou de todo o gene. Geralmente estão associados a fenótipos mais graves, já que o efeito na proteína é bastante drástico;

6. *Inversões*: são causadas por rearranjos na estrutura do gene, ocasionados por recombinação da seqüência dos nucleotídeos provocada por homologias na ordem destes nucleotídeos dentro da estrutura gênica. Normalmente, provocam uma grande alteração no fenótipo do paciente.

Técnicas Laboratoriais

Muitas técnicas laboratoriais são utilizadas para a análise molecular de doenças genéticas. Nos últimos anos, os procedimentos vêm sendo automatizados gradativamente, o que irá propiciar a realização de maior número de testes em um curto espaço de tempo.

Uma listagem de protocolos disponíveis para diagnóstico molecular de doenças genéticas pode ser encontrada na tabela 1. A escolha do protocolo específico será baseada nas características da doença e/ou do gene envolvido, da experiência e condições do laboratório a ser realizada a análise e no grau de confiabilidade que se deseja atingir ao final da mesma.

Considerações gerais sobre os protocolos mais utilizados para o diagnóstico molecular de doenças genéticas encontram-se abaixo.

Extração de DNA

A extração e purificação do DNA podem ser realizadas por protocolos que utilizam reagentes preparados no próprio laboratório ou através do uso de *kits* comerciais, que simplificam o procedimento mas, em geral, aumentam o custo do exame.

Todos os protocolos se baseiam no rompimento das células nucleadas (a), rompimento da membrana nuclear (b) e separação do DNA das proteínas através de precipitação e posterior solubilização do DNA em solução aquosa (c).

A fonte de obtenção de DNA, assim como a técnica utilizada para extração do mesmo, influenciam diretamente na qualidade e na quantidade do material ao final do processo.

O DNA pode ser obtido a partir de qualquer tecido que contenha células nucleadas. Em genética médica, por razões práticas, a principal fonte de DNA são os glóbulos brancos obtidos a partir de sangue periférico. O sangue pode ser coletado diretamente por punção venosa, utilizando, preferencialmente, EDTA como anticoagulante. A coleta de sangue em heparina não é recomendável, por ser um potencial inibidor da reação de PCR.

Outra forma de coleta de sangue é realizando

Tabela 1: Métodos utilizados na análise molecular

Gene desconhecido	Gene conhecido/ Mutações desconhecidas	Gene conhecido/ Mutações conhecidas
Estudos de ligação com RFLP	Southern blot	PCR + Digestão com enzimas de restrição
	PCR	Hibridização com oligonucleotídeos alelo
	RT-PCR	específicos (mutações de ponto)
	Multiplex-PCR	Amplificação (PCR) com oligonucleotídeos-específicos
	SSCP	Sequenciamento
	DGGE	
	Análise do mismatch químico	
	Análise de heteroduplex	
	Sequenciamento	

RFLP – polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição; RT-PCR – PCR após a transcrição reversa; SSCP – análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples; DGGE – eletroforese em gel com gradiente desnaturante.

impregnação do mesmo em papel filtro, material que poderá ser posteriormente eluído e utilizado para extração de DNA, tanto com o uso de *kits* comerciais ou com protocolos adaptados para este tipo de material. Alternativamente, o papel filtro pode ser utilizado diretamente na reação de PCR. O sangue pode ser armazenado a -20°C por, pelo menos, um ano tempo antes de ser utilizado para extrair DNA e os papéis filtro podem ficar em geladeira por muitos anos, desde que se tome o cuidado de secar o sangue completamente antes do armazenamento. Uma outra alternativa, principalmente quando se trata de crianças pequenas, é a extração a partir de lavado ou raspado bucal. Esses métodos não invasivos apresentam o inconveniente de gerarem um quantidade muito menor de DNA do que a extração a partir de sangue periférico.

Outra fonte comum de DNA, especialmente nos casos de diagnóstico pré-natal, são as vilosidades coriônicas e as células do líquido amniótico. Neste caso, a principal vantagem é que os exames podem ser feitos diretamente no material, sem necessidade de cultivo prévio. Entretanto, é importante tomar cuidado com uma possível contaminação por células de origem materna.

Biópsias de pacientes e células em cultura também são utilizadas como fonte de obtenção de DNA. As biópsias são especialmente úteis em estudos de câncer ou doenças mitocondriais, casos

em que tecidos específicos podem apresentar diferenças na constituição do material genético com relação ao DNA do resto do corpo.

Finalmente, DNA pode ser obtido a partir de material armazenado, como tecidos em blocos de parafina ou de amostras de urina congeladas. Estas fontes são úteis para estudos retrospectivos, nos quais não é possível obter material diretamente dos pacientes.

De um modo geral, a técnica de PCR pode ser realizada com pouca quantidade de DNA e mesmo com um DNA fragmentado. Por outro lado, técnicas de hibridização, como *Southern blot*, necessitam da utilização de grandes quantidades de DNA e em boas condições, isto é, íntegro. Neste caso, o uso de técnicas que utilizam solução de fenol-clorofórmio no procedimento aumenta a qualidade e quantidade do DNA extraído. Por exemplo, a extração de DNA mitocondrial pode ser feita com a mesma técnica utilizada para extração de DNA nuclear de sangue periférico, mas resultados melhores são obtidos utilizando-se extração com fenol-clorofórmio.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada na análise molecular de doenças, desenvolvida por Mullis em 1985 (1). Esta técnica permite a análise de regiões específicas de um gene ou de fragmentos de cDNA. A PCR é um método *in vitro*, simples e rápido, que permite a

síntese enzimática de seqüências específicas de DNA gerando até 10 cópias a partir de uma única molécula alvo. Esta técnica permite a detecção e a análise de seqüências gênicas específicas em uma pequena amostra do paciente.

Uma reação de PCR padrão requer os seguintes componentes:

- DNA alvo: o DNA a ser amplificado;
- Oligonucleotídeos iniciadores (ou *primers*): em geral são dois pequenos oligonucleotídeos sintéticos que hibridizam com as regiões complementares no DNA alvo e adjacentes à região de interesse a ser analisada, servindo como um ponto de partida para a síntese de duas novas fitas de DNA;
- DNA polimerase: enzima que cataliza a formação de DNA a partir da adição de novos nucleotídeos complementares ao DNA alvo;
- Desóxi-ribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs): são os 4 nucleotídeos essenciais para a síntese de novas fitas de DNA pela DNA polimerase;
- Tampão de reação: fornece as condições de pH assim como o cofator para a reação.

A PCR constitui-se de uma série repetida de ciclos (em média de 30 a 35) envolvendo os seguintes passos:

- desnaturação do DNA → aquecimento da reação a 90-95°C para que o DNA alvo se apresente como fita simples)
- anelamento → resfriamento da reação para permitir a hibridização do *primer* com o DNA alvo de fita simples. Neste passo, a temperatura se baseia na T_m (*melting temperature*) dos *primers* que deve ser calculada de acordo com a sua composição em pares de base.
- extensão → a DNA polimerase sintetiza uma nova fita de DNA, tendo como molde a fita original, que

por sua vez tem como início o sítio de anelamento dos *primers*. Neste passo, a temperatura varia normalmente de 72 a 74°C, dependendo da temperatura ideal de atividade da enzima.

O resultado desta reação, que se completa em algumas horas, é o acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas terminações 5' dos *primers*. Um exemplo dos resultados obtidos, após a análise por eletroforese, encontra-se na figura 1.

Variações do protocolo básico da PCR são utilizadas em aplicações específicas e ganham denominações próprias. Algumas delas são:

1. RT-PCR: esta técnica combina a síntese do DNA complementar (cDNA), que é obtida através de RNA por transcriptase reversa, com a amplificação por PCR (Veres *et al*, 1987 (2) não está nas referências). O método é utilizado na detecção e análise de RNA mensageiro (mRNA) em células e tecidos bem como na clonagem de DNA complementar (cDNAs). Brevemente, *primers* constituídos apenas de uma seqüência de nucleotídeos T (oligo dT) são utilizados para hibridizar a terminação poli A do mRNA e assim obter cDNA total, através de uma reação que utiliza a enzima transcriptase reversa. Após obtenção de cDNA total, uma reação de PCR normal com *primers* específicos para o gene escolhido é realizada para obtenção de uma quantidade de material suficiente para análise;

2. PCR Multiplex: é uma variação da técnica normal de PCR, onde são amplificados simultaneamente mais de um fragmento de DNA em um mesmo tubo de reação. Neste caso, são utilizados na reação mais de um par de *primers*, que hibridizam em regiões distintas do DNA. É uma

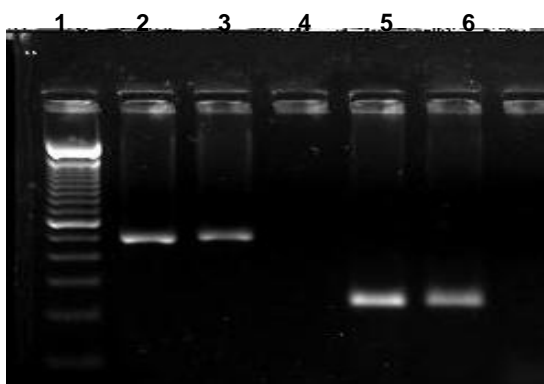


Figura 1. Produto amplificado dos exons 9 e 7 do gene IDS (MPS II). M: marcador de peso molecular; 1 e 2: produto amplificado do exon 9; 3: controle negativo do exon 9; 4 e 5: produto amplificado do exon 7; 6: controle negativo do exon 7.

técnica utilizada rotineiramente para detecção simultânea de várias mutações e/ou para utilizar um controle interno de amplificação;

3. ARMS-PCR: método utilizado para detecção de mutações que não se encontram situadas em um sítio de restrição. Neste caso, utiliza-se um oligonucleotídeo complementar à seqüência normal do gene e um oligonucleotídeo complementar à seqüência mutante, em tubos de reação separados, visando uma amplificação alelo-específica.

A partir da obtenção de um produto amplificado, diversas técnicas podem ser utilizadas para a identificação de possíveis alterações na seqüência de DNA presentes nestes fragmentos, tais como digestão com endonucleases de restrição, SSCP, etc.

Eletroforese

A eletroforese é a técnica usada para separação de fragmentos de DNA, sendo utilizada para análise dos resultados de outros procedimentos laboratoriais, como extração de DNA, PCR, digestão com enzimas de restrição, etc. A mesma consiste na aplicação de uma corrente elétrica por uma fase semi-móvel (suporte), fazendo com que as moléculas migrem de acordo com a sua carga elétrica e peso molecular. A escolha do tipo e da concentração do suporte depende do tamanho dos fragmentos que se deseja separar e da necessidade de resolução dos mesmos, sendo utilizados em geral géis de agarose ou poliacrilamida. A corrente elétrica é conduzida por um tampão salino, em geral TAE (Tris-Acetato-EDTA) ou TBE (Tris-Borato-EDTA). O tempo de corrida também varia com o tamanho do fragmento que se deseja visualizar, utilizando-se, como referência, os chamados "marcadores de peso molecular" para estimativa do tamanho do fragmento visualizado.

Digestão com endonuclease de restrição

São enzimas de clivagem do DNA que reconhecem seqüências curtas de bases e fazem um corte na dupla hélice do DNA. Cada enzima reconhece apenas um tipo de seqüência palindrômica. Algumas cortam a molécula, produzindo pontas retas, enquanto que outras cortam entre as mesmas duas bases mas fora do ponto de simetria, produzindo pontas desiguais. A temperatura de reação varia, assim como a

necessidade de uso de outros adjuvantes como BSA. As enzimas de restrição do tipo coesivas são utilizadas para clonagem, devido à facilidade de ligação dos fragmentos por elas gerados.

Enzimas de restrição são bastante utilizadas para detecção de mutações. Algumas enzimas de restrição reconhecem sítios raros no genoma e são utilizadas, por exemplo, para digestão prévia ao *Southern blot*.

No caso da detecção de mutações de ponto utiliza-se uma enzima que tem seu padrão de corte alterado pela mutação, isto é, um sítio de restrição é criado ou abolido para determinada enzima. É preciso antes conhecer o padrão de restrição no fragmento de PCR e sempre realizar controles positivos para a digestão, além de um controle negativo (se possível) e a corrida no mesmo gel de um PCR não digerido, uma vez que a detecção se baseia na comparação dos tamanhos de fragmentos gerados (figura 2). Eventualmente, fragmentos de tamanhos que não correspondem ao padrão podem ocorrer. Nesses casos deve-se considerar a hipótese de que uma outra mutação tenha ocorrido e alterado outro sítio de restrição para a enzima.

SSCP (*Single-strand conformation polymorphism* ou Análise de conformação de cadeia simples)

Esta técnica permite detectar padrões de bandas alterados no DNA de fita simples após eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, após a coloração com prata, para evitar o uso de radioatividade. Este procedimento se baseia no fato de que duas moléculas de DNA de fita simples que diferem uma da outra por pelo menos um par de base, assumem uma conformação tridimensional diferente e migram em posições diferentes no gel (3). Assim, um fragmento de DNA de fita simples apresentando uma mutação teria uma mobilidade diferente no gel quando comparado com um fragmento de DNA normal. Esta mobilidade depende não só do tamanho do DNA a ser analisado mas também da sua conformação, que é determinada pela sua seqüência e dobramento. O SSCP é ideal para a análise de fragmentos pequenos (até 200 pb) e sua sensibilidade depende ainda de fatores como temperatura, percentagem de acrilamida e força iônica do tampão de eletroforese (3).

Um exemplo dos resultados obtidos podem ser observados na figura 3.

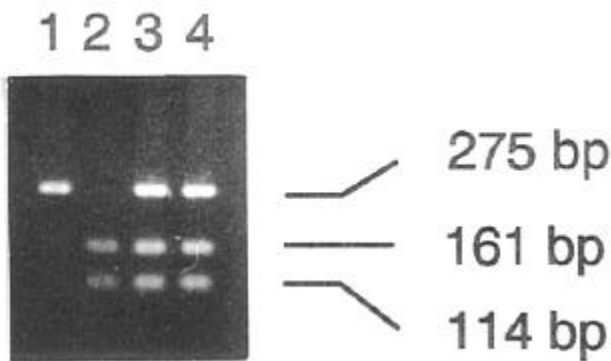


Figura 2. Detecção de uma mutação no gene da Arilsulfatase A através de digestão com endonucleases de restrição. Coluna 1 representa um indivíduo homocigoto para a seqüência normal do gene; coluna 2 representa um indivíduo homocigoto para a seqüência mutante e colunas 3 e 4 indivíduos heterocigotos.

Seqüenciamento

O seqüenciamento direto do DNA é considerado o “padrão ouro” para que se possa definir a seqüência de uma alteração de DNA. Vários métodos foram desenvolvidos para o seqüenciamento manual, sendo um dos mais utilizados o método de Sanger et al. (4), baseado na terminação de cadeia. Neste método, o *primer* utilizado para o seqüenciamento é desenhado de modo a ser complementar a uma das fitas de DNA e adjacente à seqüência de interesse, agindo como o ponto de iniciação da extensão da cadeia. Alternativamente, pode-se utilizar um dos *primers* que foram previamente usados para a PCR. Entre os componentes necessários para uma reação de seqüenciamento estão os dNTPs, que permitem a extensão da fita alvo, e os ddNTPs, análogos aos nucleotídeos mas sem o grupo hidroxila 3', necessário para a formação de uma ligação covalente com o grupo fosfato 5' do dNTP adjacente. Assim, durante a polimerização do DNA, ao ser incorporado um

ddNTP ao invés de um dNTP, o crescimento da cadeia é interrompido.

O seqüenciamento requer a realização de 4 reações que são feitas paralelamente, cada uma contendo o *primer*, o DNA alvo, a *Taq* polimerase e os dNTPs. Entretanto, para cada uma das reações é adicionada uma pequena quantidade de cada ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) separadamente, de maneira que as 4 reações são conduzidas em paralelo. A medida que a cadeia vai sendo estendida (copiada), um dos 4 ddNTPs vai sendo incorporado no lugar dos dNTPs correspondentes num processo que ocorre ao acaso, gerando fragmentos de tamanhos variados que representam uma coleção total de reações para aquela base correspondente. Estas cadeias de DNA de tamanho variado são posteriormente separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Este tipo de gel permite a separação de fragmentos que diferem em tamanho em apenas um par de base e a detecção é feita através de autoradiografia pelo uso de um dNTP ou *primer*

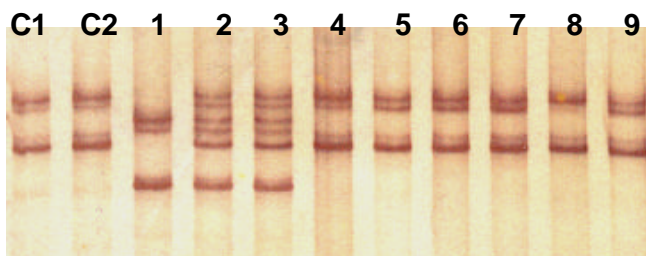


Figura 3. SSCP de um fragmento amplificado do exon 8 do gene ARSB (MPS VI). C1 e C2: Controles; 1: Paciente homocigoto; 2, 3: Irmãos heterocigotos; 4, 5, 6, 7, 8, e 9: Pacientes com padrão normal (figura gentilmente cedida por M. D. Petry)

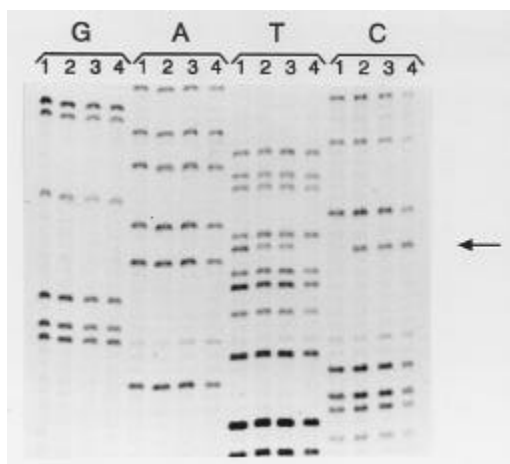


Figura 4. Seqüenciamento direto de um fragmento do gene da Arilsulfatase A. A seta indica o local da alteração T @ C que determina a mutação responsável pela doença. Coluna 1 representa um indivíduo normal; colunas 2 e 3 representam indivíduos heterozigotos; coluna 4 representa um indivíduos homozigoto para a seqüência mutante.

marcado com radioatividade na reação de seqüenciamento (figura 4). De uma maneira geral, este método permite a visualização de seqüências de fragmentos de DNA de 300-500 bases. Este método pode ser modificado pela substituição dos reagentes radioativos por *primers* marcados com fluorescência e pode ser adaptado para ser processado automaticamente.

Considerações finais

O uso dos conhecimentos da Biologia Molecular vem sendo aplicado nas mais variadas área da Medicina. No campo da genética molecular, os avanços das últimas décadas demonstram um enorme potencial desta tecnologia, que pode ser utilizada não somente no diagnóstico mas também no tratamento e prevenção de doenças hereditárias. As perspectivas para o novo século são bastante promissoras e indicam a possibilidade de grandes avanços no tratamento de doenças genéticas.

Referências

1. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1998;16:1215.
2. Saiki RD, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anaemia. *Science* 1985;230:1350-4.
3. Veres G, Gibbs RS, Scherer SE, Caskey CT. The molecular basis of the sparse fur mutation. *Science* 1987;237:415-7
4. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2766-70.
5. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7.

Aplicação da biologia molecular no diagnóstico de doenças genéticas

Sandra Leistner¹, Maria L. S. Pereira^{1,2}, Ângela A. Fachel¹, Antônio C. Burlamaque-Neto¹, Carla Streit^{1,2}, Liana Morari¹, Luciane C. Lima¹, Luiz C. S. da Silva^{1,2}, Márcia G. Petry^{1,2}, Tiago S. Carvalho^{1,2}, Úrsula Matte¹

Com os avanços da chamada Medicina Genômica, a análise molecular de doenças genéticas vem sendo cada vez mais necessária para a completa caracterização das alterações apresentadas por um indivíduo ou até mesmo essencial para um diagnóstico diferencial em muitos casos. O objetivo deste artigo é descrever os protocolos de diagnóstico molecular utilizados no laboratório de genética molecular do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que visam, em sua maioria, a utilização de técnicas atualizadas e especializadas de biologia molecular no Brasil, para permitir não apenas a caracterização do genótipo dos pacientes afetados mas também para melhorar o aconselhamento genético através do uso de técnicas e estratégias mais sensíveis e mais confiáveis para a detecção de portadores e para o diagnóstico pré-natal em gestações futuras.

Unitermos: Doenças genéticas; doenças lisossômicas de depósito; análise molecular; PCR.

Application of molecular biology techniques in the diagnosis of genetic diseases

With the advances of the so called Genomic Medicine, the molecular analysis of genetic diseases increased the needs of a full characterization of alterations shown by an individual and is becoming essential for a differential diagnosis in several cases.

The purpose of the present paper is to describe the molecular diagnostic protocols used in the Molecular Genetics Laboratory of the Medical Genetics Service of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre. Most of these protocols are aimed at the use of updated and specialized molecular biology techniques in Brazil. The objective is not only the characterization of the affected patient's genotype, but also the improvement of genetic counseling through the use of more sensitive and trustable techniques and strategies for the detection of carriers and for prenatal diagnosis in future pregnancies.

Key-words: Genetic diseases; lysosomal storage diseases; molecular analysis; PCR.

¹ Serviço de Genética Médica, Laboratório de Genética Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondência: Dra. Sandra Leistner, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: sleistner@hcpa.ufrgs.br

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Introdução

Os avanços no campo da biologia molecular permitiram o emprego de métodos mais sensíveis e rápidos na identificação de doenças genéticas, que são de grande valia no diagnóstico clínico. A identificação de famílias e uma triagem cuidadosa para mutações genéticas conhecidas deverá permitir o aconselhamento genético de indivíduos afetados e a realização de testes de triagem intervencionais para populações apropriadas. A substituição de genes mutantes ou perdidos através da utilização de técnicas de terapia gênica será possível em um futuro próximo.

A justificativa de se utilizar ferramentas de análise molecular para doenças genéticas pode se valer das seguintes afirmativas:

1. Definição de uma estratégia baseada em testes moleculares para o diagnóstico precoce preciso de pacientes afetados, para a detecção de portadores, continuidade (*follow-up*) do tratamento e planejamento terapêutico;
2. correlação das alterações moleculares encontradas com os aspectos clínicos e com a evolução da doença dos pacientes (correlação genótipo-fenótipo), contribuindo para uma previsão do prognóstico e para uma melhor definição da estratégia do tratamento em cada caso;
3. análise de populações específicas quanto à existência de um "efeito fundador" que possa propiciar um maior risco ao desenvolvimento da doença no indivíduo e seus familiares.

O objetivo deste artigo é descrever os protocolos de diagnóstico molecular utilizados no Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica, que visam, em sua maioria, o desenvolvimento e a utilização de técnicas atualizadas e especializadas de biologia molecular existentes no Brasil, para permitir não apenas a caracterização do genótipo dos pacientes afetados, mas também para melhorar o aconselhamento genético através do uso de técnicas e estratégias mais sensíveis e mais confiáveis para a detecção de portadores e diagnóstico pré-natal em gestações futuras.

Doenças lisossômicas de depósito

As doenças lisossômicas de depósito (DLD) se caracterizam por uma deficiência

protéica específica, levando quase sempre ao acúmulo de moléculas, geralmente macromoléculas, não degradadas ou parcialmente degradadas dentro dos lisossomos, o que perturba o funcionamento normal da célula.

O Laboratório de Genética Molecular desenvolve projetos de pesquisa e oferece diagnóstico molecular para algumas doenças deste grupo, que serão abordadas individualmente abaixo.

Mucopolissacaridose I (doença de Hurler)

A mucopolissacaridose I (MPS I) é uma doença lisossômica de depósito causada pela deficiência de alfa-L-iduronidase (IDUA), que leva a um acúmulo de glicosaminoglicanos (GAGs), excretados na urina. Existe um espectro contínuo de manifestações fenotípicas, mas são reconhecidas 3 formas clínicas da doença: MPS IH ou síndrome de Hurler (forma grave), MPS IS ou síndrome de Scheie (forma leve) e MPS IH/S ou síndrome de Hurler-Scheie (forma intermediária). Estudos de correlação genótipo-fenótipo têm demonstrado a importância da análise molecular para o aconselhamento genético e a escolha das abordagens terapêuticas.

O gene para a IDUA foi mapeado no braço curto do cromossomo 4 na região 16.3 (1). O gene possui aproximadamente 19 kb com 14 exons que originam um mRNA de 2.3 kb (2,3). Até o momento foram encontradas 46 mutações no gene da IDUA humano. Além disso, 30 polimorfismos ou mutações não patogênicas foram descritas. Quatro casos de pseudodeficiência também já foram descritos, resultando na ausência aparente de IDUA por ensaios *in vitro* que não é associada com um fenótipo patológico. No entanto, em apenas um dos casos o mecanismo molecular foi esclarecido (4).

No Laboratório de Genética Molecular do SGM-HCPA são analisados todos os pacientes com diagnóstico bioquímico de MPS I avaliados no Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo. São pesquisadas 10 mutações no gene da IDUA: Q70X, A75T, H82P, R89Q, 678-7g→a, L218P, A327P, R383H, W402X e P533R, através da técnica de digestão com enzimas de restrição de fragmentos amplificados por PCR.

Das 10 mutações pesquisadas por este protocolo, 6 (Q70X, R89Q, A327P, R383H,

W402X e P533R) estão presentes nos pacientes brasileiros, sendo a maioria em heterozigose. As frequências encontradas para estas mutações foram descritas por Matte et al. (5), sendo possível determinar o genótipo de 37,0% dos pacientes analisados (10/27) e correlacioná-lo com dados sobre o fenótipo clínico.

A frequência das mutações encontradas neste estudo difere da descrita para populações européias ou norte-americanas e australianas. A mutação P533R apresentou uma frequência mais elevada do que a descrita na literatura (entre 11 e 15%), enquanto A327P, R383H e R89Q encontram-se próximas das frequências obtidas em outros trabalhos. Entretanto, as mutações Q70X e W402X apresentaram frequências bastante distintas das descritas em outros estudos. Ambas são descritas como responsáveis por cerca de 60% dos alelos, enquanto em pacientes brasileiros suas frequências foram de 1,8% e 25,0% respectivamente. Este dado, além de impedir a determinação da maior parte dos genótipos, parece indicar a presença de outras mutações comuns na população brasileira, diferentes das já descritas em populações européias.

Mucopolissacaridose II (doença de Hunter)

A doença de Hunter ou MPS II é uma DLD recessiva ligada ao X que resulta de uma deficiência de L-iduronato 2-sulfato sulfatase (IDS) (EC 3.1.6.13), uma das enzimas responsáveis pela degradação seqüencial dos glicosaminoglicanos (GAGs) heparan e dermatan sulfatos (6). Um acúmulo excessivo nos tecidos e excreção pela urina destes GAGs não degradados leva ao aparecimento do fenótipo clínico característico nestes pacientes. Duas formas clínicas, moderada e grave, são reconhecidas (7). Entretanto, existe um grande espectro de severidade clínica, já que as formas moderada e grave representam apenas os dois extremos desta grande variação. Algumas destas características clínicas incluem face grosseira, hepatoesplenomegalia, deformidades ósseas, rigidez articular e envolvimento neurológico. O retardo mental é progressivo e varia de um paciente para outro. Pacientes com a forma leve da doença têm inteligência normal. Problemas cardíacos e obstrução das vias aéreas respiratórias são normalmente a causa da morte nestes pacientes. Estudos recentes mostram

uma frequência que varia de 1:116.000 a 1:140.000 nascidos vivos (8). A análise de mutações no gene da IDS em diferentes populações tem ajudado o entendimento da base molecular da doença bem como a caracterização e a relação entre genótipo e fenótipo (3).

O gene da IDS foi mapeado ao braço longo do cromossomo X na região 28.1 e um cDNA de 2.3 kb foi isolado e seqüenciado (9). A organização do gene também foi determinada, sendo que o mesmo divide-se em 9 exons separados por 8 íntrons que englobam 24kb (10,11). A presença de um pseudogene altamente homólogo aos exons 2 e 3 e introns 2, 3 e 7 no gene funcional foi publicada na literatura (12).

A MPS II apresenta uma ampla variabilidade clínica, já que a diferenciação fenotípica não é possível através do uso dos métodos bioquímicos e imunológicos desenvolvidos até o momento. Um outro problema diz respeito à identificação de portadores em doenças ligadas ao X, cuja detecção baseada em ensaios enzimáticos não é confiável devido à inativação ao acaso do cromossomo X que dá origem a uma sobreposição dos valores enzimáticos encontrados em portadoras geneticamente definidas com o de familiares portadores e de controles normais. Este fato pode originar resultados conflitantes quando da necessidade da identificação de portadores para aconselhamento genético. Nestes casos, estudos realizados através de técnicas de biologia molecular permitem a análise da segregação da mutação na família e a detecção da mutação independentemente do estado de inativação do X.

A análise molecular da doença de Hunter é extremamente útil para evitar diagnóstico pré-natal desnecessário devido à incerteza da condição de portador, isto é, quando a mutação encontrada no paciente não está presente na mãe (mutação nova) ou em outros familiares do sexo feminino.

Após a identificação do gene responsável pela MPS II, estudos sobre a natureza molecular das mutações envolvidas nesta doença começaram a ser realizados com o objetivo de explicar suas bases moleculares e caracterizar a relação entre genótipo e fenótipo nestes pacientes. Assim, começaram a ser definidas as principais mutações causadoras da doença; tal identificação passa a documentar a heterogeneidade genética esperada neste grupo

e traz as primeiras explicações para a ampla variedade de fenótipos observada.

Deleções completas e grandes rearranjos correspondem a 20% de todas as mutações encontradas no gene da IDS. A maioria das outras mutações são devido a mutações de ponto, mutações em sítio de *splicing* e pequenas deleções e inserções. Mais de 80 mutações diferentes foram identificadas até o momento, demonstrando que a doença de Hunter é geneticamente heterogênea (8). Tais mutações encontram-se espalhadas por todo o gene e ocorrem em pacientes com formas moderada, intermediária e severa da doença. Treze mutações recorrentes foram relatadas, sendo que algumas delas correspondem a *hot spots* e foram encontradas em até 10 pacientes não relacionados.

Resultados obtidos em um grupo de pacientes brasileiros com MPS II (13,14) evidenciaram que mutações comuns em outras populações não se encontram presentes entre os nossos pacientes de forma tão frequente quanto em outras populações, tornando-se necessário uma investigação mais ampla, não só através da triagem de mutações já descritas na literatura, mas também através do *screening* de novas mutações que possam ser características da nossa população. Assim, propôs-se uma linha metodológica a ser utilizada para análise molecular nestes pacientes, utilizando-se a seguinte estratégia:

1. Detecção de 4 mutações recorrentes (R172X, R468W, R468Q e R443X) no gene da IDS utilizando PCR seguido de testes simples e não-radioativos tais como digestão com enzimas de restrição, apesar de na MPS II a maioria das mutações serem únicas para cada família;
2. detecção de grandes deleções através da amplificação das extremidades 3' e 5' do gene IDS;
3. detecção de uma inversão comum que ocorre entre o gene IDS e um pseudogene extremamente homólogo a parte do gene funcional, através de amplificação por PCR dos pontos de quebra desta inversão;
4. detecção e caracterização de mutações raras causadoras da doença por análise de conformação de cadeia simples (SSCP), seguido de seqüenciamento das regiões de interesse e estabelecimento de protocolos confiáveis para a detecção de heterozigotos e diagnóstico pré-natal.

A partir desta metodologia aplicada aos pacientes é possível estabelecer protocolos confiáveis para a detecção de heterozigotos e diagnóstico pré-natal nos familiares dos pacientes afetados pela doença.

Mucopolissacaridose VI (doença de Maroteaux-Lamy)

A doença de Maroteaux-Lamy ou MPS VI é uma DLD resultante da deficiência de N-acetilgalactosamina 4-sulfatase ou arilsulfatase B (ASB) (EC 3.1.6.1), uma das enzimas responsáveis pela degradação seqüencial do dermatan sulfato. A deficiência da ASB causa acúmulo lisossomal e excreção pela urina de dermatan sulfato parcialmente degradado.

Formas clínicas grave, intermediária e leve são reconhecidas. A forma grave, tipicamente infantil, é em geral diagnosticada antes dos 2 anos de idade, apresentando rápida progressão. A forma leve se manifesta em adolescentes e adultos antes dos 20 anos, e sua progressão é lenta. A forma intermediária apresenta, como fenótipo, retardo no crescimento, face grosseira, restrição dos movimentos articulares, hepatoesplenomegalia, deformidades ósseas, disfunção da válvula aorta e opacidade de córnea. Os pacientes com forma grave de MPS VI freqüentemente morrem de complicações cardiopulmonares entre os 6 e os 30 anos de vida (8). Em contraste com a maioria dos outros tipos de mucopolissacaridoses, os pacientes com MPS VI apresentam desenvolvimento mental normal.

A avaliação clínico-laboratorial inicial dos pacientes com MPS VI pode ser feita através de testes bioquímicos rápidos e de baixo custo, sujeitos a resultados falso-positivos e falso-negativos. No caso específico de MPS VI, a análise da atividade enzimática residual não tem permitido fazer correlações com a gravidade clínica da doença, indicando somente a capacidade catalítica mínima compatível com o fenótipo normal.

O gene que codifica a ASB humana foi localizado no cromossomo 5q13-q14 por hibridização *in situ*. O isolamento e seqüenciamento do cDNA da ASB humana (15,16), possibilitou a investigação de lesões moleculares no gene da ASB em pacientes com MPS VI. O cDNA possui 2811 pb, e a organização do gene também foi determinada, sendo que o

mesmo consiste de 8 exons interrompidos por 7 íntrons (17).

Deste modo, começaram a ser definidas as primeiras mutações causadoras da doença e as primeiras explicações para a ampla variedade de fenótipos observados, sugerindo a heterogeneidade genética da MPS VI.

Aproximadamente 15 mutações já foram identificadas em pacientes com MPS VI, sendo que cada uma delas é particular para cada indivíduo. A maioria das mutações encontradas até o momento são mutações de ponto, deleção e inserção de bases. As mutações encontram-se espalhadas por todo o gene, sendo o exon 2 aquele com a maior frequência das mutações até agora determinadas.

A população brasileira parece ter uma característica bastante particular em relação às outras populações estudadas até o momento. Uma mutação comum já foi observada em diversos pacientes não relacionados, além de diversos polimorfismos encontrados quando da análise de 200 alelos normais (18).

Em vista disto, um protocolo baseado na triagem desta mutação comum é sugerido para uma análise inicial de pacientes brasileiros com MPS VI. A amplificação de todos os exons seguida de SSCP e seqüenciamento deve ser realizado para a análise de outras mutações privadas. No caso de uma mutação não ser identificada em um determinado paciente, é viável a utilização dos polimorfismos como análise de ligação através de haplótipos nestas famílias, na tentativa de mapear a herança do alelo mutado.

Com o avanço das técnicas moleculares a MPS VI parece ser um modelo apropriado para futuros protocolos de terapia gênica, já que os pacientes não apresentam retardo mental.

Doença de Gaucher

A doença de Gaucher (DG) é uma DLD caracterizada pelo acúmulo de glicocerebrosídeo, um composto intermediário no catabolismo glicolipídico. Este acúmulo é causado pela deficiência da enzima β -glicocerebrosidase (E.C. 3.2.1.45 ou β -glicosidase), uma glicoproteína ácida, ou, em casos raros, pela deficiência do ativador dessa enzima, a saposina C (SAP-C) (19). A DG é herdada de forma autossômica recessiva e é uma doença muito comum em judeus Ashkenazi.

A manifestação clínica mais comum da

doença é a esplenomegalia, acompanhada ou não de hepatomegalia. A DG pode ser subdividida em 3 tipos clínicos, que se diferenciam basicamente pelo envolvimento neurológico e progressão da doença. O Tipo 1, o mais comum dos três, se diferencia do Tipo 2 e do Tipo 3 pela deficiência de envolvimento do sistema nervoso central. O Tipo 2, a forma neuropática aguda da doença, apresenta manifestações precoces com severo envolvimento do sistema nervoso central, podendo levar à morte nos primeiros 2 anos de vida. Os pacientes com Tipo 3, forma neuropática subaguda, apresentam sintomas neurológicos com início mais tardio e de forma mais crônica do que os pacientes do Tipo 2 (19).

O gene da β -glicocerebrosidase (GBA) se localiza no braço longo do cromossomo 1 (região q21) e abrange aproximadamente 7 kb de DNA genômico, dividido em 11 exons (20) que codifica uma proteína com 497 aminoácidos. Um pseudogene que apresenta alto grau de homologia ao gene funcional se localiza a 16 kb a partir do final deste gene. Mutações no gene funcional, na sua maioria mutações *missense*, promovem a síntese de uma proteína com atividade deficiente, comprometendo ações catalíticas e/ou a estabilidade da enzima.

Mais de 100 mutações já foram identificadas e descritas no gene GBA (21), e 3 mutações apresentam uma frequência elevada na população. A mutação mais comum em judeus Ashkenazi é uma transição de adenina por guanina no exon 9 do gene GBA, que determina a substituição do aminoácido asparagina por serina no resíduo 370 da proteína (N370S). Esta mutação está associada com a forma branda da doença; pacientes homozigotos para a mesma geralmente apresentam DG Tipo 1 (21). Uma inserção de guanina no nucleotídeo 84 (ins84G) do cDNA é a segunda mutação mais freqüente em judeus, e ocasiona uma mudança no quadro de leitura da proteína (*frameshift*) antes da extremidade amino-terminal da proteína madura; desta forma o alelo mutante não produz a enzima. Uma transição de timina para citosina no exon 10 do gene GBA, que produz uma substituição de leucina por prolina no aminoácido 444 (L444P) da proteína madura, é encontrada com relativa frequência em pacientes com DG não-judeus. Esta mutação compromete a estrutura e a cinética da proteína, estando relacionada com a forma grave da doença.

Homozigotos para a mutação L444P apresentam o Tipo 1 ou Tipo 2 da doença (21).

Uma característica importante observada em pacientes com a DG é a ocorrência de alelos mutantes complexos, isto é, alelos que apresentam mais de uma mutação de ponto. Os mesmos são possivelmente gerados por *crossing over* desigual entre o gene GBA e seu pseudogene ou por eventos de conversão do gene (22). Um dos alelos mais prevalentes é o chamado *RecNcil*, que apresenta uma frequência maior na população em geral do que na população judaica, onde é raro. Este alelo compreende as mutações L444P, a mutação A456P e a mutação silenciosa V460V (23).

A partir das informações acima, a análise molecular de um paciente com DG previamente diagnosticado através da análise bioquímica no Laboratório de Genética Molecular segue a seguinte rotina laboratorial:

1. detecção das mutações N370S, L444P e c1263del55, utilizando PCR seguido por digestão com endonucleases de restrição ou PCR utilizando *primers ACRS (Amplification Created Restriction Site)* e posterior digestão com endonucleases de restrição ou *nested PCR* (duas reações de amplificação seqüenciais), dependendo da mutação a ser pesquisada;
2. detecção das mutações INS84G, IVS2+1g>a, D409H, A459P e R463C, utilizando protocolos similares aos citados acima.

Esta forma de detecção de mutações é capaz de determinar o genótipo da maioria dos pacientes, independente da etnia dos mesmos, e diferenciar a existência ou não de alelos complexos no gene GBA mutante.

Um estudo molecular em pacientes com DG provenientes de vários estados do Brasil encontra-se em andamento e os resultados preliminares indicam que as mutações mais frequentes no país são a N370S e a L444P, responsáveis por pelo menos 50% dos alelos mutantes na população brasileira.

Leucodistrofia metacromática e pseudodeficiência de arilsulfatase A

Leucodistrofia metacromática (MLD) é uma doença autossômica recessiva, em que a degradação do cerebrosídeo sulfato está deficiente. Este glicolípido sulfatado pode ser encontrado principalmente na mielina do sistema nervoso central e periférico, ocasionando uma

evidente desmielinização nestes tecidos. O início da doença, assim como sua severidade, é variável, podendo ser dividida em três formas clínicas distintas: a forma infantil, a forma juvenil e a forma adulta (24).

A degradação do cerebrosídeo sulfato é iniciada pela sua dessulfatação, a qual ocorre pela ação combinada de uma hidrolase, arilsulfatase A (ASA, EC 3.1.6.8), e por uma proteína ativadora não enzimática, a saposina B (SAP-B). A deficiência de ASA ou, mais raramente, da SAP-B causam MLD (24).

A ASA é uma glicoproteína ácida encontrada em diversos tecidos do corpo (24). O gene da ASA em humanos está localizado no braço longo do cromossomo 22 (região q13). O cDNA da ASA foi clonado e seqüenciado em 1989 (25) e o mesmo inclui 1521pb, codificando uma proteína de 507 aminoácidos, com 3 potenciais sítios de glicosilação, 2 no exon 3 e 1 no exon 6 (26). A estrutura do gene da ASA foi determinada por Kreysing et al. (27), e engloba aproximadamente 3,2 Kb do DNA genômico, dividido em 8 exons (27).

Até o momento, mais de 60 mutações foram identificadas no gene da ASA e associadas com MLD. Entretanto, 2 destas mutações apresentam uma frequência relativamente maior quando comparada com as outras mutações descritas. A primeira é causada por uma transição de G→A, que destrói o sítio de *splicing* no final do exon 2 (459+1G→A); a outra mutação é uma transição de C→T que irá causar uma substituição de prolina por leucina na posição 426 da proteína (P426L) (28).

Originalmente, a deficiência de ASA em humanos foi associada somente com MLD. A atividade da enzima pode ser medida por um ensaio laboratorial *in vitro*. Entretanto, através de ensaios enzimáticos, ficou comprovado que indivíduos clinicamente normais podem apresentar uma deficiência da atividade de ASA, condição denominada de pseudodeficiência de ASA (PD-ASA) (29).

A PD-ASA é uma situação benigna onde os indivíduos podem apresentar em torno de 5 a 15% da atividade normal da enzima, o que parece ser suficiente para evitar as manifestações da doença. Esta situação se origina da presença de 2 alterações moleculares no gene da ASA, onde ocorre troca das bases adenina (A) por guanina (G) em

pontos distintos do gene em questão, sendo denominadas N350S e 1524+95A→G (26).

A importância clínica do alelo para PD-ASA origina-se de sua alta frequência na população em geral, estabelecida em 7,3% na população alemã (30), 9,6% na população australiana (31), 12,7% na população espanhola (32), 12,3% na população britânica (33) e 7,9% na população do sul do Brasil (34).

Portanto, o diagnóstico de MLD pode ser dificultado pelo fato que a deficiência de ASA não comprova um caso de MLD e que a atividade normal de ASA não exclui MLD. A avaliação laboratorial deve ser acompanhada, sempre que possível, pelos dados clínicos do paciente. Entretanto, casos de diagnóstico pré-natal impossibilitam a avaliação clínica e prejudicam o diagnóstico apenas através da avaliação bioquímica. Desta forma, a análise molecular em casos de deficiência enzimática de ASA é essencial para a diferenciar um caso de MLD de indivíduos com ASA-PD.

Baseado nas informações acima, o protocolo utilizado para a análise molecular de pacientes ou indivíduos com baixa atividade de ASA inclui a detecção das 2 mutações mais frequentes em pacientes com MLD (459+1G→A e P426L) e a detecção das 2 alterações associadas à ASA-PD (N350S e 1524+95A→G).

Doenças neurodegenerativas

Ataxia de Friedreich

A ataxia de Friedreich (FRDA) é a doença mais comum entre as ataxias autossômicas recessivas, apresentando uma frequência que varia de 1:50.000 a 2:50.000 na população em geral. Em 1996, o gene FRDA foi clonado e caracterizado. O gene, chamado de X25, se localiza no cromossomo 9q13 e codifica uma proteína (frataxina) de 210 aminoácidos. A mutação predominantemente causadora da ataxia de Friedreich é a instabilidade de um trinucleotídeo GAA repetitivo localizado no intron 1 do gene X25, sendo responsável por até 98% dos cromossomos FRDA. Este trinucleotídeo está presente de 7 a 22 vezes em indivíduos normais. Nos pacientes, entretanto, apresenta-se aumentado de 200 a 900 vezes. Esta expansão resulta em uma expressão diminuída da proteína e é meiotica e mitoticamente instável. Poucos heterozigotos compostos para uma

expansão mais uma mutação de ponto têm sido relatados. O objetivo do trabalho desenvolvido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre é realizar o diagnóstico molecular da ataxia de Friedreich.

A estratégia utilizada é a amplificação por PCR da região do intron 1 do gene X25 contendo as repetições GAA. Os *primers* e condições usados para análise estão descritos em Filla et al. (35), originando produtos de 500+3n pares de base (n = número de repetições GAA). Estes fragmentos foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, onde o tamanho do PCR era estimado por comparação com um marcador de peso molecular de 1kb. Até o momento foram analisados 42 pacientes, na maioria encaminhados por geneticistas clínicos do Serviço de Genética Médica do HCPA com uma suspeita inicial de ataxia recessiva. Dos 42 pacientes encaminhados, 11 tiveram um resultado molecular positivo, ou seja, apresentaram um número aumentado de repetições GAA. Destes, 4 (36%) foram homozigotos (com repetições que variaram de 416 a 832) e 6 (55%) foram heterozigotos compostos para um número diferente de repetições em cada um dos alelos. Estas repetições variaram em número de 245 a 1.203. Todos os controles simultâneos utilizados tiveram um número de repetições normal, que variou de 2 a 29 repetições, sendo que em um controle heterozigoto observou-se 44 e 58 repetições em cada cromossomo respectivamente. Para um dos pacientes negativo para a análise de expansões foi realizada a análise da vitamina E através da dosagem de α -tocoferol, confirmando a hipótese diagnóstica. Em um estudo realizado em Portugal, todos os 12 casos e índices analisados (100%) eram homozigotos para expansões de GAA. Sugerimos que este fato deve ser decorrente da técnica utilizada para análise, onde a separação dos 2 cromossomos contendo as expansões é de difícil visualização e requer adaptações da amplificação de fragmentos muito longos e das condições de eletroforese utilizadas. A técnica empregada mostrou ser adequada para o diagnóstico da ataxia de Friedreich, além de permitir uma identificação correta de 2 cromossomos contendo expansões de tamanhos diferentes. Nos casos onde foi observada homozigose para um número alterado de expansões, é possível ainda que as mesmas difiram somente em

poucas repetições, sendo que esta diferença não seria visível em gel de agarose. Diferenças de 7 repetições (equivalentes a 21 pb) puderam ser detectadas com a técnica empregada neste trabalho. Como apenas 28% dos pacientes encaminhados apresentaram alterações que confirmaram a suspeita clínica inicial, sugere-se que seja definido um protocolo clínico mais focalizado, uma vez que os sintomas desta doença são bastante característicos. Nos casos negativos e persistindo a suspeita clínica deve-se considerar outras prováveis causas, tais como deficiência de vitamina E e mutações de ponto no gene X25.

Doença de Machado-Joseph

As ataxias espinocerebelares (SCAs) são um grupo heterogêneo de doenças neurodegenerativas fatais que causam incoordenação generalizada, afetando principalmente o andar, a fala e a deglutição. As SCAs geralmente se manifestam na vida adulta e apresentam grande heterogeneidade clínica e evolução lenta e progressiva. Essas doenças são caracterizadas por degeneração progressiva, afetando o cerebelo e o trato espinocerebelar em graus variáveis. Até o momento, foram caracterizadas 10 *locus* distintos das SCAs, sendo que 7 delas são comprovadamente causadas por uma expansão trinucleotídica (36).

Dentro deste grupo, a doença de Machado-Joseph (MJD) ou ataxia espinocerebelar tipo 3 (SCA3) é a mais freqüente. Suas principais manifestações clínicas são a ataxia da marcha, disartria, distonia, oftalmoplegia, hiperreflexia e disfagia (37). A MJD foi inicialmente observada em famílias de origem portuguesa do arquipélago dos Açores (incidência de 1:4000 nos Açores), mas posteriormente foram descritos pacientes sem nenhuma ascendência portuguesa.

Baseado na expressão clínica variável, Coutinho & Andrade (38) propuseram uma subdivisão para a MJD em 3 subtipos, que se diferenciam pela idade de início, pelos sinais clínicos e pela progressão da doença (37,39).

Em 1993, Takiyama et al. (40) mapearam e localizaram o gene responsável pela MJD no braço longo do cromossomo 14 (14q24.3-q32.1) e o gene identificado no ano seguinte por Kawaguchi et al. (41). Esse gene se caracteriza pela presença de repetições do trinucleotídeo CAG na porção carbóxi-terminal da proteína. A

análise das variações de tamanho desta expansão em indivíduos normais e em portadores de MJD permitiu concluir que uma expansão desta região hipervariável, que codifica uma seqüência poliglutamínica, é a base molecular da doença. Indivíduos normais apresentam entre 12 a 41 repetições, enquanto indivíduos afetados possuem entre 62 a 84 repetições (36,41). O tamanho da expansão CAG no gene da MJD está inversamente relacionado com a idade de início da doença e sua gravidade, porém o tamanho da repetição isoladamente não pode ser usado para prever a idade de início da doença (39,42).

A instabilidade intergeracional das expansões associadas à doença vem sendo investigada para explicar a ocorrência de antecipação observada nas famílias em risco. Estes estudos exploram a possibilidade de interação entre os alelos (normal e mutante) e a presença de regiões polimórficas intragênicas (43).

Um estudo realizado em pacientes do Rio Grande do Sul indica que a MJD é a SCA mais freqüente no nosso estado, totalizando 81% dos casos analisados e 92% das famílias com uma ataxia dominante (44). Além disso, os pacientes estudados foram caracterizados quanto às manifestações clínicas e quanto à alteração molecular apresentada pelos mesmos (45,46).

Antes da caracterização molecular da doença, o diagnóstico de MJD baseava-se apenas no fenótipo apresentado pelo paciente, levando, muitas vezes, a um diagnóstico tardio e tornando mais difícil o aconselhamento genético de famílias em risco. A partir do conhecimento da alteração molecular responsável pela doença, tornou-se prioritária a implementação de protocolos de investigação laboratoriais para a mesma, os quais proporcionam a detecção da presença de expansões do trinucleotídeo CAG no gene da MJD, contribuindo para o diagnóstico precoce dos doentes, ajudando no aconselhamento genético das famílias em risco e, quando indicado, proporcionando o diagnóstico de casos pré-sintomáticos.

Atualmente, todos os casos que apresentam suspeita clínica de uma ataxia dominante são encaminhados para a realização do diagnóstico molecular de MJD no nosso laboratório, através da detecção da presença ou não de uma expansão no gene MJD1. Em breve,

estaremos também disponibilizando a detecção molecular de outras SCAs.

Outras doenças genéticas

Fenilcetonúria

As hiperfenilalaninemias são doenças caracterizadas por um distúrbio na hidroxilação da fenilalanina, que resulta em níveis elevados deste aminoácido nos tecidos e no plasma dos pacientes. A fenilcetonúria (PKU) é uma das doenças deste grupo e é herdada de forma autossômica recessiva (47). O defeito básico na PKU é a deficiência hepática da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) (E.C. 1.14.16.1). A frequência desta doença é bastante variável de acordo com a população analisada; mas, de uma maneira geral, a mesma é estimada em 1 caso em cada dez mil nascimentos em caucasianos (48), o que corresponde a uma incidência de portadores de 1 em cada 50 indivíduos.

A PKU se caracteriza pelo acúmulo de fenilalanina no plasma e por distúrbios no metabolismo de aminoácidos aromáticos (47). Os sintomas envolvem lesões na pele, deficiência de pigmentação e, principalmente, alterações neurológicas. As principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes são crises convulsivas, distúrbio de comportamento, retardo mental e hipertonicidade muscular, em alguns casos acompanhada de tremores.

A anormalidade bioquímica na PKU é a deficiência de oxidação de fenilalanina em tirosina, reação catalisada pela enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) e que requer a presença de tetrahydrobiopterina como co-fator. Essa reação é o passo limitante no catabolismo que conduz até a oxidação completa de fenilalanina a CO₂ e água. Além disso, a oxidação da fenilalanina é o sistema normal de produção endógena do aminoácido tirosina, que se transforma em um aminoácido essencial no momento que esta reação metabólica pára de funcionar (47).

O locus do gene da PAH foi localizado no cromossomo 12 na região q22-q24,1 (49). O gene da PAH compreende 90 kb de DNA genômico e está dividido em 13 exons, que codificam um mRNA de aproximadamente 2,4 kb (50).

Até julho de 2000, foram registradas no banco de dados de alterações no gene da PAH

(*PAHdb*) 417 variações no gene, sendo a maioria alterações patogênicas (51). A frequência e distribuição destas mutações variam nas populações, sendo que poucas são encontradas com maior frequência na população em geral (independentemente da origem do indivíduo).

A frequência das mutações em pacientes com PKU que se encontram em tratamento no Serviço de Genética Médica do HCPA foi analisada recentemente e foi determinado que as seguintes mutações são as mais frequentes nesta amostra analisada: a I65T (18,2%), a R261X (9,1%), a R408W (9,1%), a IVS2nt5g>c (7,3%), a R261Q (7,3%) e a V388M (7,3%) (52). Este estudo propiciou o estabelecimento do protocolo básico de investigação molecular de pacientes com PKU enviados ao Laboratório de Genética Molecular. Este protocolo abrange a detecção das mutações I65T, R261X, R261Q, R408W e V388M nos pacientes que tenham avaliação bioquímica prévia compatível com deficiência de PAH.

Fibrose cística

A Fibrose Cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais comum em caucasianos, com uma incidência estimada em 1 caso em cada 2 mil a 3 mil nascimentos, dependendo da população (53). A doença se caracteriza por infecções crônicas do trato respiratório, insuficiência pancreática e concentrações elevadas de eletrólitos no suor.

A patologia da FC afeta o epitélio de diversos órgãos, como o trato respiratório, o trato gastro-intestinal, o pâncreas, o trato gênito-urinário e as glândulas sudoríparas (53). Infecções recorrentes e persistentes das vias aéreas, especialmente por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, causam bronquites e falha respiratória, que a longo prazo podem causar a morte do paciente (53). Insuficiência pancreática exócrina está presente na maioria dos pacientes com FC e a deficiência da secreção da enzima pancreática causa má-absorção de gorduras (esteatorréia) e deficiente ganho de peso. Íleo meconial ao nascimento é frequentemente diagnóstico da doença. O envolvimento do trato gênito-urinário se caracteriza por alterações estruturais nos ductos e se reflete pela falha da função reprodutiva, principalmente em pacientes do sexo masculino. A alteração funcional mais consistente em FC é

a presença de concentrações elevadas de cloreto, sódio e potássio no suor, e estes parâmetros são utilizados como teste diagnóstico para esta doença. Essa alteração é causada primariamente pela impermeabilidade de cloreto nos ductos das glândulas sudoríparas (53).

O gene da FC se localiza no cromossomo 7q31,2 e a proteína codificada por este gene foi denominada *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR). O CFTR abrange 250 kb de DNA genômico e a sua região codificante está dividida em 27 exons (54-56). O mRNA produzido tem 6,5 kb e, considerando a seqüência do cDNA do CFTR, a estrutura da proteína é composta por 1.480 aminoácidos.

Mais de 800 mutações no gene CFTR foram identificadas pelos membros do Comitê Internacional de Análise Genética da Fibrose Cística. A mutação mais freqüente associada à FC é causada por uma deleção de 3 bp no 10º exon com a perda de fenilalanina na posição 508 da proteína (56), denominada deltaF508. Um estudo realizado em uma amostra de pacientes em tratamento no Serviço de Pneumologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre mostrou que essa mutação é responsável por 48,7% dos genes mutantes causadores de FC (51). Apenas 4 outras mutações apresentam uma freqüência acima de 1% na população mundial. Baseado neste sistema, ótimos testes diagnósticos foram desenvolvidos para a identificação das mutações $\Delta F508$, G542X, G551D e 621+1G \rightarrow T, freqüentes na população britânica.

A freqüência da DF508 foi estimada, em média, em 47% na população caucasóide brasileira, mas diferentes freqüências foram observadas entre as diferentes regiões estudadas (58).

Síndrome do X-frágil

A síndrome do X-frágil é a forma mais comum de retardo mental hereditário em homens (aproximadamente 1:1.250). A principal mutação responsável por esta síndrome consiste de um número aumentado de repetições instáveis de trinucleotídeos (CGG), sendo que estas expansões estão localizadas num "sítio frágil" denominado FRAXA, na região 5' não traduzida do gene FMR-1, localizado no braço longo do cromossomo X (Xq27.3). Como conseqüência desta alteração, não existe formação do produto, o que pode ser causado por uma metilação

anormal da região contendo a repetição (59).

Indivíduos afetados são portadores de mais de 200 cópias destes trinucleotídeos, ao invés do normal que seria de 2-50 cópias. O tamanho destas repetições CGG pode aumentar de uma geração para a próxima e o número de repetições pode ser demonstrado pela técnica do *Southern blotting* como fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (60). Uma pré-mutação aparece como um fragmento um pouco maior que o normal e a mutação plena aparece como fragmentos bem maiores. Com este procedimento, um diagnóstico genotípico confiável é possível.

Mais recentemente, um outro "sítio frágil", denominado FRAXE, foi identificado e está localizado na mesma região do cromossomo X, porém distal àquele encontrado no FRAXA. Neste caso, uma repetição GCC contendo mais de 200 cópias está presente em indivíduos afetados, ao invés das 6-25 repetições encontradas em sujeitos normais.

Como a técnica do *Southern blotting* é relativamente cara e trabalhosa, outras técnicas de triagem também foram desenvolvidas, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* que flanqueiam as regiões suscetíveis à mutação. Para ambos, os loci FRAXA e FRAXE e análise dos produtos em gel de agarose e/ou poliacrilamida. Além destes, *primers* específicos para análise de metilação no gene FMR-1 também podem ser usados para confirmar os achados anteriores obtidos por PCR (59). Entretanto, esta técnica pode ser aplicada apenas aos pacientes do sexo masculino e não identifica as pré-mutações. A realização do *Southern blotting* é necessária para identificar o tamanho das expansões nos casos positivos de triagem e para a identificação dos portadores de pré-mutações.

Deficiência de alfa-1-antitripsina

A α_1 -antitripsina (α_1 AT) é o principal inibidor de proteases presente no plasma. Existem mais de 75 formas desta proteína que se diferenciam pelo seu ponto isoelétrico. A maioria destes alelos condicionam uma redução nos níveis de α_1 AT, sendo o mais comum o Pi*Z. As principais complicações associadas ao alelo Pi*Z são doença pulmonar obstrutiva crônica e doença hepática. Uma parcela dos portadores do alelo Pi*Z apresenta icterícia colestática e cirrose. A forma Z apresenta um defeito de secreção que

leva à deficiência de α_1 AT e à formação de inclusões nos hepatócitos dos indivíduos afetados. O gene que codifica a proteína está localizado no braço longo do cromossomo 14, na região 14q32.1, possuindo 12,2Kb, divididos em 7 exons (61). Na prática clínica, as doenças hepáticas têm sido associadas aos genótipos PiZZ, PiSZ e PiZ(*null*). O alelo Pi*Z é a variante deficiente mais comum. Pacientes Pi ZZ possuem de 10 a 15% da quantidade normal de α_1 AT funcionalmente ativa. Pacientes homocigotos para este alelo possuem uma predisposição maior ao desenvolvimento de hepatopatia. Também há uma relação entre doença hepática crônica e presença do alelo Z em heterozigose.

O alelo Pi*Z resulta de uma substituição da glutamina da posição 342 por uma lisina (Glu³⁴²→Lys) no exon V da seqüência codificante da α_1 -antitripsina (63). A determinação do alelo Pi*Z utiliza a técnica de PCR com amplificação do exon V do gene da alfa-1-antitripsina e detecção da mutação E342K baseada na técnica de Andresen et al. (64) modificada, utilizando *primers* ACRS (*Amplification Created restriction site*) e posterior digestão com enzima de restrição visualizada através de gel de poliacrilamida e coloração com brometo de etídio.

Através desta técnica não é possível determinar o genótipo dos indivíduos (a menos que o mesmo seja homocigoto), apenas a presença do alelo Z, sendo que o outro alelo pode ser qualquer outro dos cerca de 70 já descritos.

Lima et al. (65), a partir da análise de 29 pacientes de Porto Alegre, encontraram 7 alelos alterados em 58 analisados, o que leva a uma frequência de 12,06% para o alelo Pi*Z. Neste mesmo trabalho também foram analisados 100 controles para a determinação da frequência do alelo Pi*Z na população de Porto Alegre. Foi encontrado apenas um indivíduo heterocigoto entre os 100 analisados, resultando em uma frequência de 0,50%. Esse valor é um pouco menor do que o encontrado em outras populações etnicamente relacionadas, porém não chega a ser estatisticamente significante.

Conclusões

O diagnóstico baseado em análise do DNA é o único teste definitivo para determinar o estado portador de familiares de pacientes portadores

de Doenças Lisossômicas de Depósito. Entretanto, para que esta estratégia seja utilizada, é indispensável o diagnóstico enzimático inicial e o conhecimento da mutação causadora da doença no paciente afetado. Nem sempre a relação do quadro clínico (fenótipo) do paciente com as informações genéticas (genótipo) é direta e conclusiva. Nestes casos, é necessária a análise individual de cada caso e de cada mutação, principalmente no caso de mutações únicas para cada família.

Referências

1. Scott HS, Ashton LJ, Eyre HJ, Baker E, Brooks DA, Callen DF, et al. Chromosomal localization of the human α -L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3. *Am J Hum Genet* 1990;47:802-7.
2. Scott HS, Anson DS, Orsborn AM, Nelson PV, Clements PR, Morris CP, et al. Human α -L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9695-9.
3. Scott HS, Bunge S, Gal A, Clarke LA, Morris CP, Hopwood JJ. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I: diagnostic, clinical and biological implications. *Hum Mut* 1995;6:288.
4. Aronovich EL, Pan D, Whitley CB. Molecular Genetic Defect Underlying α -L-iduronidase Pseudodeficiency. *Am J Hum Genet* 1996;58:75-85.
5. Matte U, Leistner S, Lima L, Schwartz IVD, Giugliani R. Unique frequency of known mutations in Brazilian MPS I patients. *Am J Med Genet* 2000;90(2):108-9.
6. Bach G, Eisenberg F, Cantz M, Neufeld EF. The defect in the Hunter syndrome: deficiency of sulfiduronate sulfatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2134-8.
7. Young ID, Harper PS, Newcombe RG, Archer IM. A clinical and genetic study of Hunter's syndrome: Differences between the mild and severe forms. *J Med Genet* 1982;19:408-11.
8. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.3421-52.
9. Wilson PJ, Morris CP, Anson DS, Occhidoro T, Bielicki J, Clements PR, et al. Hunter syndrome: isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone

- and analysis of patient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87: 8531-5.
10. Flomen RH, Grenn EP, Green PM, Bentley DR, Giannelli F. Determination of the organisation of coding sequences within the iduronate sulphate sulphatase (IDS) gene. *Hum Mol Genet* 1993;2:5-10.
 11. Wilson PJ, Meaney CA, Hopwood JJ, Morris CP. Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics* 1993;17:773-5.
 12. Bondeson M-L, Malmgren H, Dahl N, Carlberg B-M, Petterson U. The presence of an IDS-related locus (IDS-2) in Xq28 complicates the mutational analysis of the Hunter syndrome. *Eur J Hum Genet* 1995;3:219-27.
 13. Leistner S. Molecular genetics of Hunter disease and the pseudodeficiency of arylsulphatase A [tese]. London (UK): University College London; 1996.
 14. Scherer L. Estudos bioquímicos, genéticos e moleculares na MPS II. [dissertação]. Porto Alegre (RS); 2000.
 15. Peters C, Schmidt B, Rommerskirch W, Rupp K, Zuhlssdorf M, Vingron M, et al., Phylogenetic conservation of arylsulphatases. cDNA cloning and expression of human arylsulphatase B. *J Biol Chem* 1990;265:3374-81.
 16. Schuchman EH, Jackson CE, Desnick RJ. Human arylsulphatase B: MOPAC cloning, nucleotide sequence of a full-length cDNA, and regions of amino acid identity with arylsulphatases A and C. *Genomics* 1990;6:149-58.
 17. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher Disease. In: Scriver CR, Beaud, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3635-65.
 18. Petry M. 2000 (comunicação pessoal).
 19. Beutler E, Grabowski GA. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaud Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3635-65.
 20. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics* 1989;4:87-96.
 21. Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ, et al. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type I and type III Gaucher disease. *Am J Med Genet* 2000;66:1777-86.
 22. Zimran A, Horowitz M. Rect 1 – A complex allele of the glucocerebrosidase gene associated with a mild clinical course of Gaucher disease. *Am J Med Genet* 1994;50:74-8.
 23. Cormand B, Harboe TL, Gort L, Campoy C, Blanco M, Chamoles N, et al. Mutation analysis of Gaucher disease patients from Argentina: high prevalence of the RecNcil mutation. *Am J Med Genet* 1998;80:343-51.
 24. von Figura K, Gieselmann V, Jaeken J. Metachromatic Leukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3695-3724.
 25. Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, et al. Cloning and expression of human arylsulphatase A. *J Biol Chem* 1989;264:1252-9.
 26. Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, von Figura K. Arylsulphatase A pseudodeficiency: loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989;86:9436-40.
 27. Kreysing J, von Figura K, Gieselmann V. The structure of the arylsulphatase A gene. *Eur J Biochem* 1990;191:627-31.
 28. Polten A, Fluharty AL, Fluharty CB, Kappler J, von Figura K, Gieselmann V. A single origin for the most frequent mutation causing late infantile metachromatic leukodystrophy. *J Med Genet* 1991;324:28.
 29. Dubois G, Turpin JC, Baumann N. Absence of ASA activity in the healthy father of a patient with metachromatic leukodystrophy. *N Engl J Med* 1975;293:302.
 30. Hohenschutz C, Eich P, Friedl W, Waheed A, Conzelmann E, Propping P. Pseudodeficiency of arylsulphatase A: a common genetic polymorphism with possible disease implications. *Hum Genet* 1989;82:45-8.
 31. Nelson PV, Carey WF, Morris CP. Population frequency of the arylsulphatase A pseudodeficiency allele. *Hum Genet* 1991;87:87-8.
 32. Chabas A, Castellvi S, Bayes M, Balcells S, Grinberg D, Vilageliu LI et al. Frequency of the arylsulphatase A pseudodeficiency allele in the Spanish population. *Clin Genet* 1993;44:320-3.
 33. Barth ML, Ward C, Harris A, Saad A, Fensom A. Frequency of arylsulphatase A pseudodeficiency-associated mutations in a healthy population. *J Med Genet* 1994;31:667-71.
 34. Pedron CG, Gaspar PA, Giugliani R, Pereira MLS.

- Arylsulphatase A pseudodeficiency in healthy Brazilian individuals. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:941-5.
35. Filla a, De Michele G, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Campanella G, Coccozza S. The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Genet* 1996;59(3):554-60.
 36. Zoghbi HY, Orr HT. Spinocerebellar Ataxias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 5741-58.
 37. Sequeiros J, Coutinho P. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. In: Harding A, Deufel T, Cahmberlain S, editors. *Hereditary Ataxias*. *Adv. Neurol* 61. New York: Raven Press 1993. p. 139-53.
 38. Coutinho P, Andrade C Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. *Neurology* 1978;28:703-9.
 39. Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, et al. CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet* 1995;57:54-61.
 40. Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, et al. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature Genet* 1993;4:300-3.
 41. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet* 1994;8:221-8.
 42. Silveira I. Mapeamento cromossômico da doença de Machado-Joseph e heterogeneidade genética das ataxias dominantes [tese] Porto (Portugal): Universidade do Porto; 1997.
 43. Maciel P, Gaspar C, Guimarães L, Goto J, Lopes-Cendes I, Hayes S, et al. Study of three intragênica polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)_n tract. *Eur J Hum Genet* 1999;7:147-56.
 44. Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, Moreira MC, et al. A survey on autosomal dominant spinocerebellar ataxia in South Brazil – clinical and molecular studies of 49 families with Machado-Joseph disease or SCA7. *J Neurol* 2001a; in press.
 45. Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R. Machado-Joseph disease: clinical and molecular characterization of kindreds from South Brazil. *Acta Neurol Scan* 2001;104(4):224-31.
 46. Jardim LB, Pereira ML, Silveira I, Ferro A, Sequeiros J, Giugliani R. Neurologic findings in Machado-Joseph disease – relation with disease duration, subtypes, and (CAG)_n. *Arch Neurol* 2001;58(6):899-904.
 47. Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.1667-1724.
 48. Bickel H, Bachmann C, Beckers R. Neonatal mass screening for metabolic disorders. *Eur J Pediatr* 1981;137:133-9.
 49. Lidsky AS, Law ML, Morse HG, Kao FT, Woo SLC. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6221-5.
 50. DiLella AG, Kwok SCM, Ledley FD, Marvit J, Woo SLC. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry* 1986;25:743-9.
 51. <http://www.mcgill.ca/pahdb>
 52. Silva LCA. Identificação e caracterização molecular de mutações e polimorfismos no gene da fenilalanina hidroxilase em fenilcetonúricos do sul do Brasil [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
 53. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic Fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 5121-80.
 54. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-65.
 55. Riordan J R, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73.
 56. Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TIC, Chakravati A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1073-80.
 57. Streit C. Análise de mutações em pacientes com Fibrose cística nascidos no sul do Brasil [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1998.

58. Raskin S, Philips III JA, Krishnamani MRS, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, et al. Cystic fibrosis in the Brazilian population: DF508 mutation and *KM-19 / XV-2C* haplotype distribution. *Hum Biol* 1997;69:499-508.
59. Warren ST, Scherman SL. The Fragile X Syndrome. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.1257-89.
60. Eichler EE, Holden JA, Popovich BW, Reiss AL, Snow K, Thibodeau SN, et al. Length of the uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genet* 1994;8:88-94.
61. Cox DW. α -1-Antitrypsin deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7 ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p. 2465-87.
62. Chuan G. Alpha-1-antitrypsin deficiency. In: Altschuler SM, Liacouras CA, editors. *Clinical Pediatric Gastroenterology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 1998.
63. Gregersen N, Winter V, Petersen KB, Koch J, Kolvraa S, Rudiger N, et al. Detection of point mutations in amplified single copy genes by biotin-labelled oligonucleotides: diagnosis of variants of alpha-1-antitrypsin. *Clinica Chimica Acta* 1989;182:151-64.
64. Andresen BS, Knudsen I, Jensen PKA, Rasmussen K, Gregersen N. Two novel nonradioactive polymerase chain reaction-based assays of dried blood spots, genomic DNA, or whole cells for fast, reliable detection of Z and S mutations in the antitrypsin gene. *Clinical Chemistry* 1992;38(10):2100-7.
65. Lima LC, Matte U, Leistner S, Giugliani R, Silveira TR. Molecular analysis of the Pi*Z allele in patients with liver disease. *Am J Med Genet* 2001;104(4):287-90.

Investigação de erros inatos do metabolismo

Moacir Wajner¹, Carmen R. Vargas¹, Maira Burin¹,
Roberto Giugliani¹, Janice C. Coelho¹

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

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

Investigation of inborn errors of metabolism

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

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

Revista HCPA 2001(3):343-360

Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sintomas sugestivos de doenças metabólicas hereditárias

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

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

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

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

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

Neonato

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

Criança até os 10 anos de idade

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

Adolescente até a fase juvenil

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

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

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

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

Diagnóstico

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

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

Quando o paciente não apresenta sintomas sugestivos de doenças lisossômicas

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

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

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

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

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

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

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

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

As aminoacidopatias (AAC) e as

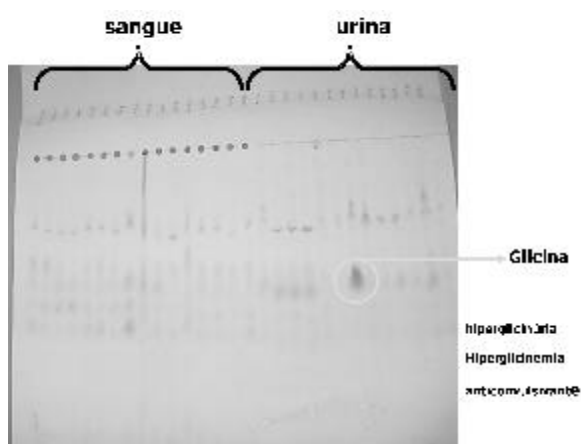


Figura 1. Cromatografia em papel de aminoácidos em sangue e urina.

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

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

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

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

O diagnóstico das aminoacidopatias e

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

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

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

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

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

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

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

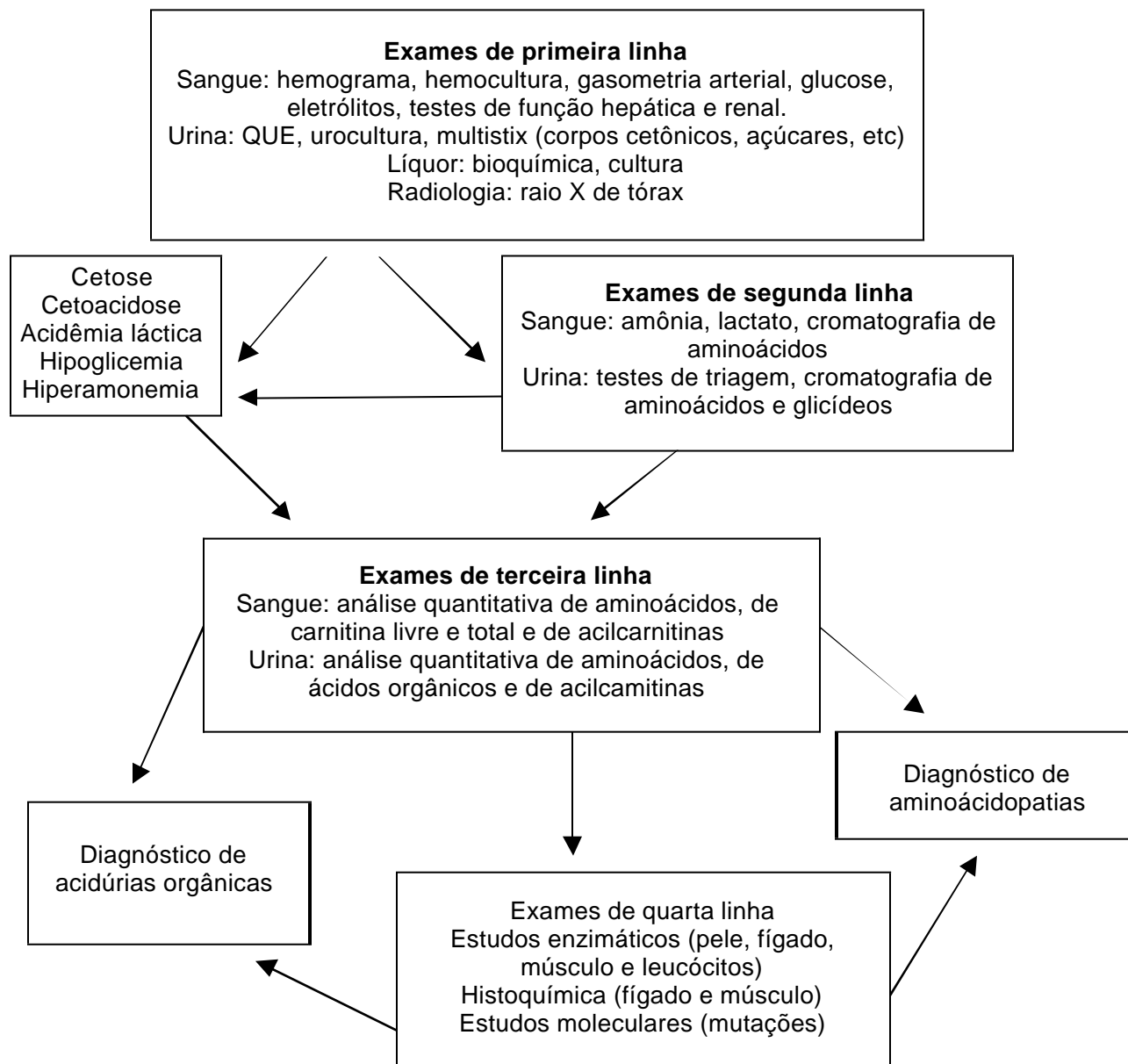


Figura 2. Protocolo para o diagnóstico das aminoacidopatias e das acidemias orgânicas em recém-nascidos e neonatos em crise.

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

As amostras de sangue e urina para a

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

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

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

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

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

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

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

diagnosticadas pelo aumento dos níveis urinários de vários ácidos orgânicos.

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

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

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

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

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

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

Doenças de depósito ou de moléculas complexas

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

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

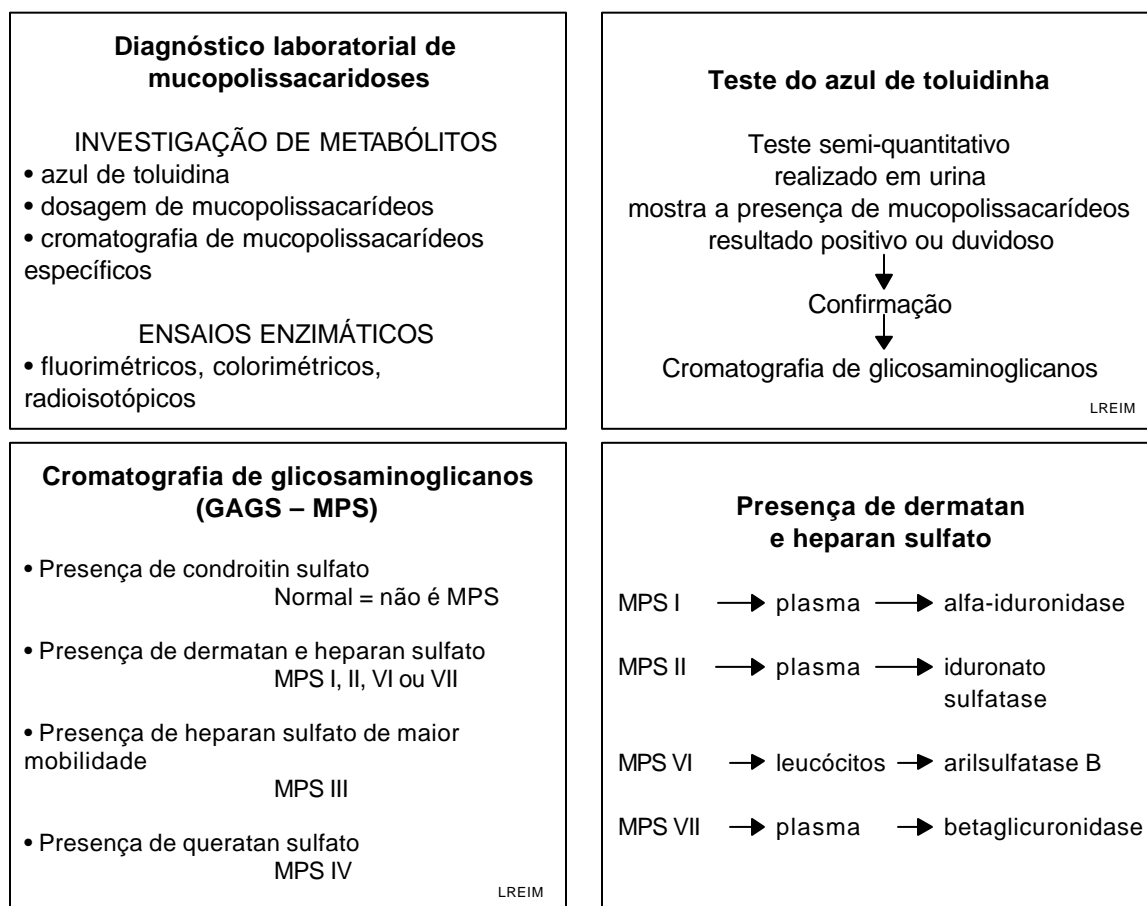


Figura 3. Diagnóstico de mucopolissacaridoses

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Desordens peroxissomais

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

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

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

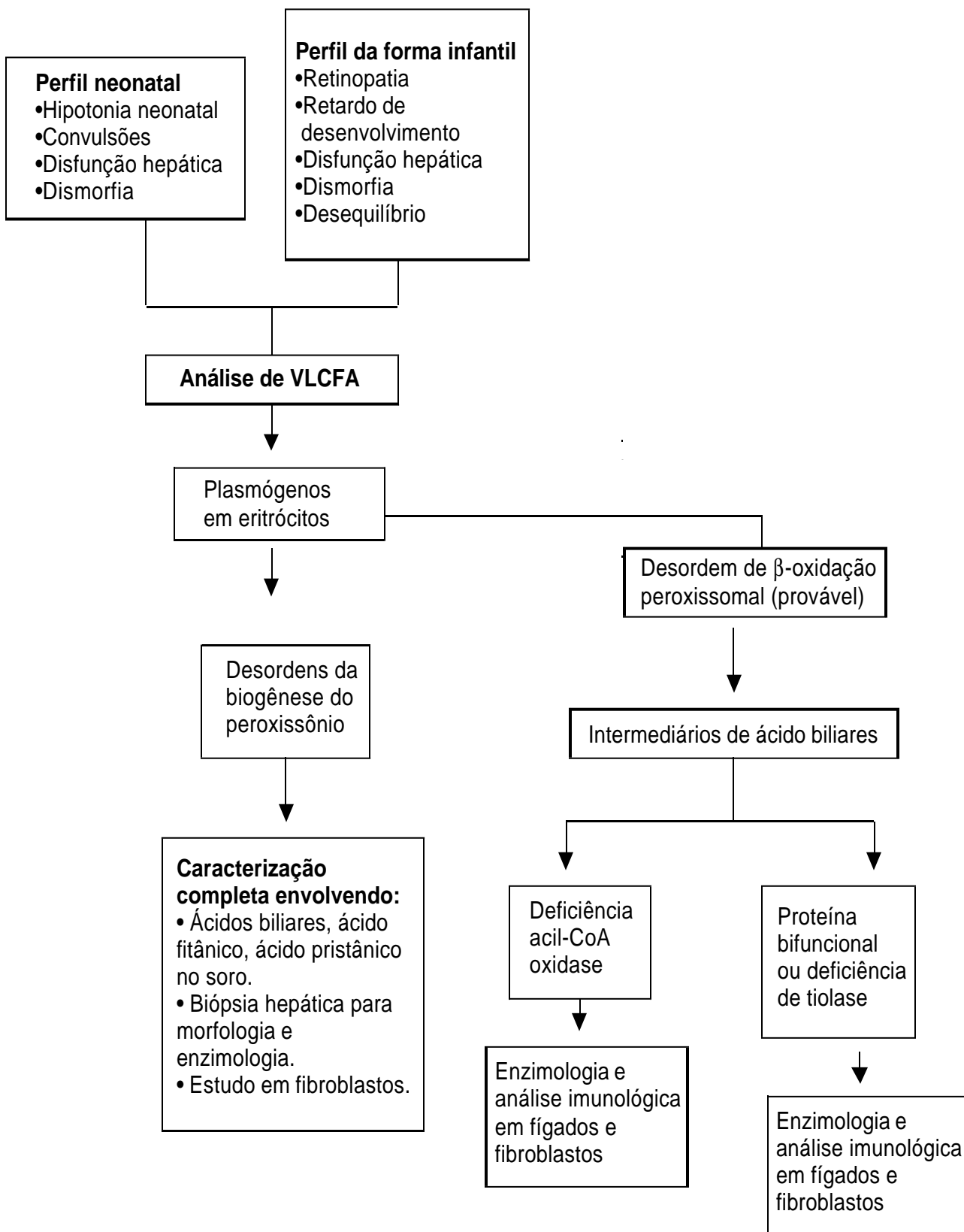


Figura 4. Protocolo para investigação das desordens da biogênese dos peroxissomais e de β-oxidação peroxissomal.

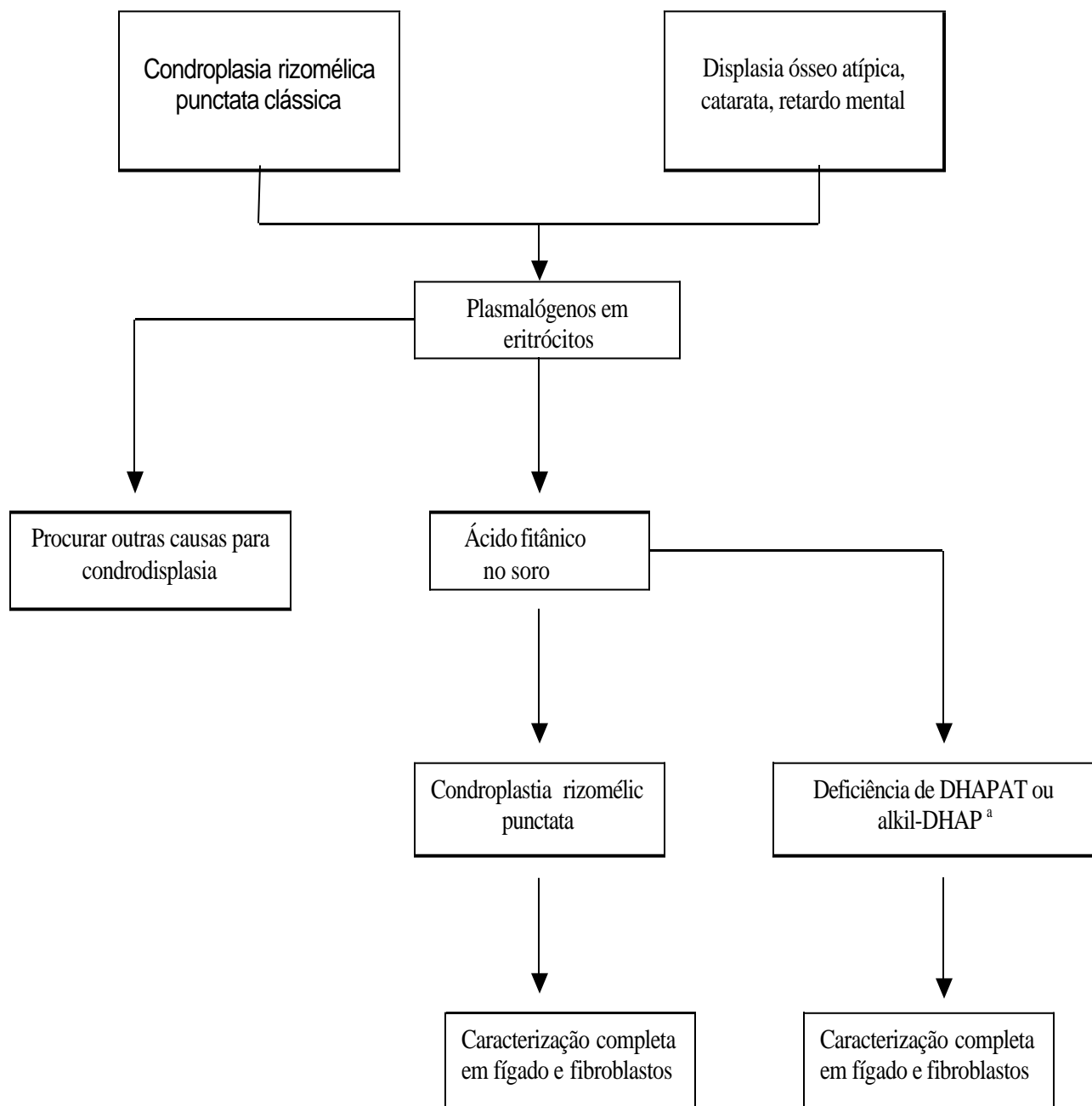


Figura 5. Protocolo para investigação de condrodissplasia rizomélica punctata e distúrbios relacionados

^a alquil-dihidroxiacetona-fosfato sintetase

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

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

Tabela 9. Determinação de ácidos graxos de cadeia muito longa

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

(14)

Referências

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

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

Avaliação de teratógenos potenciais na população brasileira: a experiência do Sistema Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos em Porto Alegre (SIAT)

Lavínia Schüler-Faccini^{1,2}, Maria T. V. Sanseverino¹, Rossana M. Peres^{1,2}

O Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos (SIAT) foi implantado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, em 1990, com a proposta de fornecer a médicos e à população em geral informações rápidas e atualizadas sobre os riscos reprodutivos relacionados à exposição a agentes teratogênicos. O SIAT, que foi o primeiro serviço deste tipo a operar na América Latina também é uma importante fonte de dados para investigações prospectivas sobre teratogenicidade em humanos. Neste artigo nós relatamos a experiência deste serviço nos seus primeiros 11 anos de funcionamento e suas possíveis contribuições. A introdução em anos posteriores de outros três serviços similares em outras três capitais brasileiras (Rio de Janeiro, São Paulo e Salvador), faz com que a integração destes quatro serviços dentro de uma rede nacional coordenada aumente o potencial do SIAT tanto no que diz respeito a cuidados de saúde como à pesquisa.

Unitermos: teratógenos; gestação; defeitos congênitos.

Assessment of the potential teratogens in the Brazilian population: National System of Information about Teratogenic Agents (SIAT) experience in Porto Alegre city

The National System of Information about Teratogenic Agents (SIAT) was set up in Porto Alegre, Southern Brazil, in 1990, with the purpose of providing doctors and the general public with rapid and updated information about the reproductive risks related to exposure to teratogenic agents. SIAT, which was the first service of this kind to operate in Latin America, is also an important source of data for prospective investigations about teratogenicity in humans. In this paper we report the experience of this service during its first eleven years and its possible contributions. The introduction in the following years of similar services in other Brazilian cities (Rio de Janeiro, São Paulo and Salvador) and the operation of all four services within an integrated and coordinated national network enhance the potential of this service regarding health care and research.

Key-words: teratogens; pregnancy; birth defects.

Revista HCPA 2001(3):361-367

Introdução

Os danos reprodutivos na espécie humana podem ser agrupados em classes

principais: 1. morte do concepto; 2. malformações; 3. retardo de crescimento intra-uterino; e 4. deficiências funcionais, incluindo-se aqui o retardo mental. Estes danos podem tanto

¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondência: Dra. Lavínia Schüler-Faccini, Rua Ramiro Barcelos 2350, 3º andar, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: siat@hcpa.ufrgs.br
² Departamento de Genética/IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Tabela 1. Danos reprodutivos na espécie humana

Efeito	Incidência/ 100 nascimentos	População
Abortamentos espontâneos	10 - 15	todas as gestações
Anomalias cromossômicas em abortos espontâneos	40 - 50	abortamentos
Natimortalidade	1 - 2	todos os nascimentos
Malformações congênitas	3 - 5	nativos
Retardo mental severo	3	crianças

ter uma causa genética como ambiental e, muitas vezes, uma combinação destas duas (etiologia multifatorial). Estima-se que cerca de 15% de todas as gestações reconhecidas terminem em aborto e que de 3 a 5% de todos os recém-nascidos vivos apresentem algum defeito congênito (1,2). A tabela 1 apresenta um panorama geral destas frequências (1,3,4).

Nas perdas gestacionais, estima-se uma contribuição de causas cromossômicas em mais de 50% dos abortamentos espontâneos. Com relação aos defeitos congênitos, causas genéticas parecem ser responsáveis por 15-20% destes, fatores ambientais são reconhecidamente responsáveis por 7%, 20% são de etiologia multifatorial, mas em mais de 50% dos casos a causa permanece desconhecida (1).

Os danos reprodutivos decorrentes de exposições ambientais: teratógenos

A partir da tragédia da talidomida no início dos anos 60, o interesse pelo conhecimento, prevenção e tratamento das anomalias do desenvolvimento humano tem aumentado progressivamente.

Um agente teratogênico é definido como qualquer substância, organismo, agente físico ou estado de deficiência que, estando presente durante a vida embrionária ou fetal, produz uma alteração na estrutura ou função da descendência (5).

A ação de um agente teratogênico sobre o embrião ou feto em desenvolvimento depende de diversos fatores, destacando-se: estágio de desenvolvimento do conceito; relação entre dose

e efeito; genótipo materno-fetal, e mecanismo patogênico específico de cada agente (6).

Com respeito aos medicamentos, a possível relação de seu uso durante a gravidez com o aparecimento de efeitos adversos sobre o embrião ou o feto gera um grande número de dúvidas. Estima-se que um ser humano possa estar exposto a aproximadamente 5 milhões (5.000.000) de diferentes substâncias químicas, mas destes apenas em torno de 1.500 foram testados em animais e pouco mais de 30 são comprovadamente teratogênicos no homem (7). Este pequeno número se deve às dificuldades de investigação de teratogenicidade nos humanos. Estudos epidemiológicos a partir de monitorização de defeitos congênitos não têm tido sucesso na identificação de novos teratógenos, especialmente devido à necessidade de grandes números amostrais e controles padronizados (8-11). Além disto, os estudos retrospectivos dependem de uma história materna acurada e já se reconhece claramente a existência de "vícios de memória", seja em mães com filhos normais ou malformados (12).

Tradicionalmente, os estudos experimentais em animais fornecem a base de triagem para a verificação do potencial teratogênico de um determinado agente. Estas investigações têm o papel fundamental de elucidar os princípios e mecanismos da teratogênese, mas não têm sido bem sucedidos na identificação de teratógenos humanos devido às diferenças genéticas entre as espécies. Por exemplo, os corticosteróides, potentes teratógenos em roedores, são aparentemente seguros para o homem; por outro lado, a talidomida, um teratógeno potente para o homem,

é aparentemente seguro para a maioria dos animais. Assim, a evidência definitiva de que se uma droga é teratogênica ou não para humanos deve ser procurada no próprio homem.

Até hoje, a identificação dos teratógenos para o homem tem sido realizada principalmente pela observação inicial feita por clínicos atentos na prática médica diária. Este foi o caso, por exemplo, da rubéola e da talidomida (13,14). Estudos epidemiológicos, entretanto, são fundamentais para confirmar ou afastar estas hipóteses. A detecção do ácido valpróico como um teratógeno em humanos é um exemplo de uma hipótese levantada através de observação clínica (15) que foi imediatamente testada através de dados de registros locais (16) e finalmente confirmada por estudos epidemiológicos em outros locais (17-19).

Sistemas de informação sobre agentes teratogênicos: o SIAT em Porto Alegre

Considerando que a bibliografia sobre teratogenicidade é muito ampla, se encontra espalhada em diversos tipos de revistas científicas e precisa constantemente ser atualizada, surgiram em diversos países da Europa e América do Norte serviços especializados em fornecer este tipo de informação a médicos e pacientes em geral. Estes serviços difundiram-se especialmente durante a década de 80 e apresentam-se também como importantes fontes de dados para investigação sobre potencial teratogênico de diversos agentes, através do exame dos recém-nascidos de mães expostas. Seu caráter prospectivo evita o viés de memória materna, além de reunir um número grande de gestantes expostas a diversas substâncias (20,21). O seguimento dos recém-nascidos, nestes casos, é de fundamental importância.

O SIAT (Sistema Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos) foi implantado no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em agosto de 1990, vinculado ao departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), e é o primeiro sistema desta natureza a operar na América Latina. Atualmente, está incorporado ao *European Network of Teratogenic*

Information Services (ENTIS), que congrega entidades congêneres em todo o continente europeu. O SIAT é um serviço telefônico gratuito que fornece informação sobre riscos reprodutivos relacionados à exposição de mulheres grávidas a agentes químicos, físicos e biológicos. Destina-se a gestantes, médicos ou pesquisadores em geral. O SIAT atua também na investigação da teratogenicidade de agentes ambientais através do seguimento e observação do resultado de todas estas gestações (22). Em 1994, foi implantada uma modalidade de operação via fax e que é oferecida para médicos e pesquisadores do Brasil e da América Latina, recebendo consultas até agora principalmente do Brasil, Uruguai e Argentina. Finalmente, com a criação de uma home-page (<http://www.hcpa.ufrgs.br/siat>) que pode receber consultas via Internet, o SIAT passou a prestar informações também para fora de nosso continente.

Até junho de 2001, foram atendidas 3.744 consultas no nosso serviço. Dos consulentes, 42,1% eram as próprias pacientes e 39,4% eram os médicos, havendo um aumento na taxa de profissionais da área da saúde que procuram este serviço em comparação às análises anteriores. Em 66,1% as consultas eram sobre gestações em curso. Em relação à escolaridade, 57% das pacientes tinham secundário completo ou grau superior. Com relação aos motivos de consulta, em 71,3% dos casos o motivo foi um fármaco, em 10,6% relacionado a outras substâncias químicas, em 4,4%, infecções maternas, e 2,7% devido a radiações, o que segue o padrão das análises anteriores.

A partir de 1992, vinculados ao SIAT de Porto Alegre, foram criados dois sistemas similares na cidade do Rio de Janeiro na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e na Escola Paulista de Medicina, em São Paulo. Mais recentemente criaram-se SIATs em Campinas, SP; Salvador, BA; Buenos Aires, Argentina; Montevideu, Uruguai; e Assunção, Paraguai. Em implantação supervisionada pelo nosso serviço e apoiada pela Agência Brasileira de Cooperação (Itamaraty) e pela Organização Pan-Americana de Saúde, está sendo criado um SIAT na Colômbia, Bogotá.

Uma outra ênfase do SIAT é a formação de recursos humanos, sendo que já passaram pelo SIAT mais de 40 bolsistas de iniciação científica, 6 médicos de outras localidades para

treinamento, e foram realizados cinco mestrados (concluídos), e dois doutoramentos atualmente em curso.

Finalmente, a elaboração de um livro texto de consulta médica sobre o tema da teratogênese (23) procura ampliar o aspecto de disseminação da informação atualizada e baseada em evidências para a comunidade científica e médica.

Potenciais teratógenos em populações de países em desenvolvimento: as pesquisas desenvolvidas pelo SIAT

As populações de países em desenvolvimento, como o Brasil, apresentam características sociais, políticas e econômicas muito particulares para a compreensão de potenciais riscos teratogênicos aos quais uma mulher grávida possa estar exposta. Estas características incluem níveis educacionais e econômicos baixos da população, alta incidência de doenças infecciosas e carenciais, escassos recursos para saúde e pesquisa, prática freqüente e sem controle de auto-medicação, facilidade de obtenção de medicações que deveriam estar submetidas à prescrição médica e, finalmente, proibição legal de interrupção da gestação. Além disto, pode somar-se uma qualidade ambiental precária ou mesmo condições insalubres de trabalho durante a gravidez. Para ilustrar, este quadro leva a situações como a existência de casos freqüentes de embriopatia pelo vírus da rubéola ou mesmo a ocorrência de síndrome da talidomida fetal em regiões onde a hanseníase é endêmica (24).

Um exemplo mais recente no nosso País é o caso do misoprostol, uma prostaglandina que tem sido freqüentemente usada pelas gestantes no Brasil como um abortivo e que foi identificada como um potencial teratógeno por trabalhos desenvolvidos em grande parte por nossa equipe (25-27).

No Brasil e no Rio Grande do Sul, ainda são escassos os estudos visando os riscos teratogênicos potenciais aos quais a nossa população possa estar exposta, estudos estes importantes para mostrar os focos para os quais as estratégias de prevenção devem se voltar. Por outro lado, a maioria da literatura sobre teratogenicidade em humanos é publicada a partir de investigações nos países desenvolvidos.

Desta forma, alguns agentes aos quais nossa população pode estar exposta são desprovidos de qualquer informação científica sobre sua segurança. Assim, os estudos de teratogenicidade sobre estes agentes devem ser realizados em nosso próprio meio.

Desta forma, o SIAT, no momento, conduz uma série de projetos específicos visando a elucidação de potenciais riscos teratogênicos em situações particulares do nosso meio e que estão sumarizados abaixo.

Projetos de pesquisa desenvolvidos pelo SIAT

Fatores de risco teratogênico em gestantes de baixa renda e classe média de Porto Alegre, RS

Trata-se de um estudo descritivo transversal, baseado em postos de saúde em vilas pobres do município de Porto Alegre e em ambulatório de acompanhamento pré-natal hospitalar do mesmo município. Os objetivos principais são caracterizar uma amostra de gestantes, atendidas em postos de saúde de regiões pobres em Porto Alegre e em dois hospitais gerais desta cidade, quanto à freqüência do uso de medicação durante a gravidez, tipo do medicamento, automedicação e período gestacional; caracterizar esta amostra quanto a outros fatores de risco teratogênico: uso de álcool, fumo, drogas ilícitas, presença de doenças crônicas, infecções maternas, tentativas de abortamento; comparar o padrão de uso de medicamentos entre mulheres classificadas em dois grupos: de baixo *status* sócio-econômico e de *status* sócio-econômico médio/alto; comparar o padrão de uso de medicamentos entre as pacientes atendidas em postos de saúde com as dos hospitais. Foram realizadas entrevistas através de um questionário estruturado a 412 gestantes de vilas pobres da cidade de Porto Alegre e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Estas gestantes foram divididas de acordo com o nível sócio-econômico em de baixa renda (n = 275) ou de classe média (n = 137). Quanto ao uso de medicamentos, 77% das mulheres usaram pelo menos um medicamento durante a gravidez. Os principais fatores de risco significativamente aumentados nas gestantes de baixa renda, quando comparados com as de classe média foram: freqüência de gestações em adolescentes (28,4% vs. 12,4%); freqüência de

automedicação (21,8% vs. 13,1%); hábito de fumar (21,5% vs 5,1%); gestações não planejadas (69,5% vs. 51,8%); gestações não desejadas (31,3% vs. 10,9%) e tentativas de abortamento (13,1% vs. 5,8%). Este estudo aponta a existência de fatores de risco específicos na nossa população, especialmente na camada de menor nível socio-econômico, onde particularmente um grande número de gestações indesejadas e de tentativas frustradas de aborto são observadas (28).

Riscos reprodutivos relacionados ao uso de misoprostol durante a gravidez

O misoprostol é uma prostaglandina E comercializada para o tratamento de úlceras ou de gastrites mas que promove também a contratilidade uterina. Por esta razão, em países onde o aborto voluntário é proibido, como no Brasil, existe um grande número de mulheres que usam esta substância como meio de interromper a gravidez. Muitas destas gestações, entretanto, não são perdidas e existe uma preocupação quanto ao potencial risco teratogênico decorrente.

Em animais, a droga não se mostrou teratogênica. Acumulam-se relatos de casos retrospectivos em humanos, de crianças com defeitos de redução de membros e/ou seqüência de Moebius (29) associados ao uso desta substância pelas mães durante o período de embriogênese. Desde então, vários outros casos têm sido relatados em congressos, incluindo s. Moebius e lesões variadas do sistema nervoso central (30). Na nossa experiência (26), no seguimento de 64 gestantes que deram à luz a recém-nascidos vivos, não foi observado aumento na taxa de defeitos maiores. Também nenhum caso de Moebius, defeitos cranianos ou redução de membros foi registrado nesta amostra. Por outro lado, um estudo caso-controle também organizado pelo grupo do SIAT com 94 crianças com seqüência de Moebius detectou uma freqüência significativamente mais alta de uso de misoprostol no primeiro trimestre (por tentativas de abortamento) nas mães destas crianças quando comparadas a um grupo controle de 94 crianças com defeitos de fechamento de tubo neural (25). Finalmente um terceiro estudo também realizado com a colaboração do SIAT (27) mostrou uma associação mais ampla entre uso de misoprostol e defeitos de disrupção vascular de uma maneira

geral. A conclusão atual é de que o misoprostol é um teratógeno quando usado no primeiro trimestre de gravidez, podendo levar à perda gestacional, ou a malformações - especialmente seqüência de Moebius -, defeitos de redução de membros e diversas anomalias do sistema nervoso central. Considerando a alta freqüência de seu uso como abortivo e um estudo prospectivo negativo, estima-se grosseiramente que seja menor que 10% dos fetos expostos. Sendo assim, estamos fazendo o seguimento de gestações de mulheres que contataram o Sistema Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos (SIAT) devido ao uso de misoprostol na gravidez, na tentativa de estabelecer um risco e um determinado padrão de anomalias associado.

Riscos à saúde embrio-fetal relacionados à exposições ambientais e ocupacionais durante a gravidez

Existem no Brasil muito poucos trabalhos avaliando os riscos à saúde embrio-fetal decorrentes da contaminação proveniente da atividade industrial. Em países desenvolvidos esta é uma preocupação fundamental, já que os defeitos congênitos assumiram o primeiro posto na causa de mortalidade infantil. No Brasil, a crescente industrialização ainda não acompanhada, muitas vezes, de protocolos de segurança efetivos pode potencialmente acarretar riscos reprodutivos à população exposta. Neste sentido, no momento estamos conduzindo as seguintes investigações específicas no estado do Rio Grande do Sul sobre este tema e cujos resultados são apresentados mais detalhadamente em um artigo em separado:

1. **Freqüência de defeitos congênitos em região carbonífera: um estudo no Rio Grande do Sul:** Visa estimar os prováveis efeitos deletérios sobre o embrião ou feto em desenvolvimento decorrentes de exposição materna durante a gravidez a contaminantes em uma região carbonífera do estado do RS. Faz parte de uma dissertação de mestrado (31).

2. **Malformações congênitas, mortes perinatais e baixo peso ao nascimento na região do pólo petroquímico do Rio Grande do Sul:** Trata-se de um estudo tipo caso-controle, fazendo parte de um projeto mais amplo em colaboração com a FEPAM-RS (CIAMB-PADCT) e que procura identificar se existe

associação entre os desfechos acima citados e uma possível contaminação gerada pelo Pólo Petroquímico situado na região dos municípios de Montenegro e Triunfo, no RS. Faz parte de uma dissertação de mestrado (32).

3. Associação entre a atividade industrial e defeitos congênitos na região sul do Brasil:

Trata-se de um estudo tipo ecológico em que, a partir de uma grande matriz comparando frequências de defeitos congênitos específicos em municípios industrializados do nosso estado e atividades industriais, procura-se gerar hipóteses sobre possíveis associações entre exposições a poluentes industriais e defeitos congênitos. Em um segundo momento esta investigação testará as hipóteses geradas através de um estudo tipo caso-controle. Faz parte de uma tese de doutoramento (33).

Avaliação da medida da translucência nugal em gestantes com risco elevado de anomalia fetal

A medida da translucência nugal entre 11-14 semanas de gestação é um exame ultrasonográfico obstétrico desenvolvido para identificação de fetos com anomalias cromossômicas, principalmente a trissomia 21 (Síndrome de Down). Com a crescente utilização dessa técnica, diversas outras anormalidades fetais têm sido descritas em associação a um aumento da translucência nugal no final do primeiro trimestre de gestação, incluindo erros inatos do metabolismo (EIM), displasias esqueléticas, outras doenças gênicas e múltiplas malformações fetais (34,35).

O objetivo deste trabalho é avaliar a associação dos resultados da medida da translucência nugal em diferentes situações de risco para anomalias fetais e estimar as medidas de desempenho diagnóstico congênitas (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo) da medida da translucência nugal nas diversas anormalidades. Trata-se de um estudo transversal observacional envolvendo 720 gestantes com risco aumentado de anomalia congênita avaliadas no ambulatório de Aconselhamento Genético para Diagnóstico Pré-natal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em um período de 3 anos. As diferentes situações de risco incluem: mulheres com idade avançada, história familiar de EIM, história familiar de outras doenças gênicas, antecedentes de

malformações, uso de teratógenos e outras situações de risco para o feto. Para todas elas, será solicitada uma ultra-sonografia obstétrica com medida da translucência nugal entre 11 e 14 semanas de gestação, e posteriormente será avaliado o desfecho da gestação. Após serão realizadas as análises estatísticas pertinentes. Faz parte de uma tese de doutoramento (36).

Agradecimentos

Aos bolsistas do SIAT Aruza Quintana, Camila Giugliani, Candice E. S. Santos, Carolina Friedrich, Carolina Waldman, Charles A. Carvalho, Cristine S. Costa, Denise Gomes, Haley Calcagnotto, Jane Mattei, Karlo Biolo, Leovegildo P. Martins, Lívia Andreoni, Luciana Johann, Márcio Perin, Marcos Henriques, Osvaldo Artigalás, Rafaela F. Herman, Renan D. Cabral, Simone Matiotti, Tiago Lansini. À Liliane Koester pelo apoio administrativo. Às agências de fomento: CNPq, FAPERGS, FINEP, PROPESQ-UFRGS e FIPE-HCPA.

Referências

1. Kalter H, Warkany J. Congenital malformations: etiological factors and their role in prevention (first of two parts) *N Engl J Med* 1983;308:424 -31.
2. Baird PA, Sadovnick AD. Occurrence of neural tube defects among first-degree relatives of probands in British Columbia. *Am J Med Genet* 1984;17(4):859-60.
3. Opitz JM. Tópicos recentes em genética clínica. Ribeirão Preto: Ed. Soc. Bras. Genética; 1988.
4. Winter RM, Knowles SAS, Bieber FR, Baraitser M. The malformed fetus and stillbirth. Chichester: John Willey & Sons; 1988.
5. Dicke JM. Teratology: principles and practice. *Medical Clinics of North America* 1989;73:567-82.
6. Wilson JG. Current status of teratology. In: Wilson JG & Fraser FC, editors. *The handbook of teratology*. New York: Plenum Press; 1977.
7. Sheppard TH. *Catalog of teratogenic agents*. 7th ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 1992.
8. Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS. On monitoring the multiply malformed infants: case finding, case recording, and data handling in a Latin American program. *Am J Med Genet* 1985;22:717-25.

9. Kallen B. Search for teratogenic risks with the aid of malformation registries. *Teratology* 1987;35:47-52.
10. Khoury M. Epidemiology of birth defects. *Epidemiol Rev* 1989;11:244-8.
11. Robert E. Handling surveillance types of data on birth defects and exposures during pregnancy. *Reproductive Toxicology* 1992;6:205-9.
12. Clavijo HA. Estudo sobre o consumo de medicamentos, álcool e fumo por gestantes na região de Porto Alegre, e avaliação do potencial teratogênico implicado [dissertação]. Porto Alegre (RS): UFRGS; 1991.
13. Lenz W. A personal perspective on the thalidomide tragedy. *Teratology* 1992;46:417-8.
14. Lipson AH. Thalidomide retrospective: what did the clinician teratologist learn? *Teratology* 1992;46:411-3.
15. Robert E, Guibaud P. Maternal valproic acid and congenital neural tube defects. *Lancet* 1982;2:937.
16. Robert E, Lofkvist E, Mauguier F. Valproate and spina bifida. *Lancet* 1984;2:1392.
17. Lindhout D, Meinardi H. Spina bifida and in utero exposure to valproate. *Lancet* 1984;2:396.
18. Martinez-Frias ML, Salvador J, Rodriguez-Pinilla E. Valproate and spina bifida. *Lancet* 1989;1:1392-3.
19. Mastroiacovo P, Bertollini R, Morandini S, Segni G. Maternal epilepsy, valproate exposure and birth defects. *Lancet* 1983;2:1499.
20. Koren G. Maternal fetal toxicology: a clinician's guide. New York: Marcel Dekker Inc; 1993.
21. Eléfant E, Boyer M, Boyer P, Galliot B, Roux C. Teratogenic agent information centre: fifteen years of counseling and pregnancy follow-up. *Teratology* 1992;46:35-44.
22. Schüler L, Sanseverino MT, Clavijo HA, Ashton-Prolla P, Boianowsky K, Pecis F, et al. Preliminary report on the first Brazilian teratogen information service (SIAT). *Rev Bras Genet* 1993;16(4):1085-95.
23. Sanseverino MTV, Spritzer DT, Schuler L (org). Manual de Teratogênese. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2001.
24. Castilla EE, Ashton-Prolla P, Barreda-Mejia E, Brunoni D, Cavalcanti DP, Correa-Neto J, et al. Thalidomide, a current teratogen in South America. *Teratology* 1996;54:273-7.
25. Pastuszak A, Schüler L, Speck-Martins CE, Coelho KE, Cordello S, Brunoni D, et al. Use of misoprostol during pregnancy and Moebius syndrome in infants. *New Engl J Med* 1998;338(26):1881-5.
26. Schüler L, Pastuszak A, Sanseverino MTV, Orioli IM, Brunoni D, Ashton-Prolla P, et al. Pregnancy outcome after exposure to misoprostol in Brazil: a prospective, controlled study. *Reproductive Toxicology* 1999;13(2):147-51.
27. Vargas FR, Schuler-Faccini L, Brunoni D, Kim C, Meloni VFA, Sugayama SMM, et al. Prenatal exposure to misoprostol and vascular disruption defects: a case-control study. *Am J Med Genet* 2000; 95(4):302-6.
28. Momino W. Fatores de risco teratogênico em gestantes de baixa renda e classe média de Porto Alegre, RS [dissertação]. Porto Alegre: UFRGS; 2001.
29. Gonzalez CH, Vargas FR, Perez AB, Kim CA, Brunoni D, Marques-Dias MJ, et al. Limb deficiency with or without Moebius sequence in seven Brazilian children associated with misoprostol use in the first trimester of pregnancy. *Am J Med Genet* 1993;47:59-64.
30. Gonzales CH, Marques-Dias MJ, Kim CA, Sugayama SM, Da Paz JA, Huson SM, et al. Congenital abnormalities in Brazilian children associated with misoprostol misuse in first trimester of pregnancy. *Lancet* 1998; 351:1624-7.
31. Leite JCL, Schüler-Faccini L. Congenital defects in a coal mining region. *Rev Saúde Pública* 2001; 35:136-41.
32. Minussi L. Fatores de risco para malformações congênitas, baixo peso ao nascimento e perdas gestacionais na população do município de Montenegro [dissertação]. Porto Alegre: UFRGS; 2000.
33. Peres RM. Associação entre atividade industrial e defeitos congênitos: um estudo ecológico na região sul do Brasil [tese em andamento]. Porto Alegre: UFRGS; 2001.
34. Billardo CM, Pajkr E, De Graaf I, Mol W, Blecker OP. Outcome of fetuses with enlarged nuchal translucency and normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998;11:401-6.
35. Brady AF, Pandya PP, Yuksel B, Greenough A, Patton MA, Nicolaidis KH. Outcome of chromosomally normal livebirths with increased fetal nuchal translucency at 10-14 weeks' gestations. *J Med Genet* 1998;35:222-4.
36. Sanseverino MTV. Avaliação da medida da translucência nuchal em gestantes com risco aumentado de anomalia congênita [tese em andamento]. Porto Alegre: UFRGS; 2001.

Exposição a contaminantes ambientais durante a gestação e seus efeitos sobre a saúde fetal: uma revisão de literatura

**Rossana M. Peres¹, Maria T. V. Sanseverino²,
Lavínia Schüler-Faccini³**

A exposição humana a contaminantes ambientais é onipresente. Uma grande preocupação em relação à população que vive perto de fontes poluentes é o risco potencial de efeitos adversos para as gestações, especialmente defeitos congênitos. Excetuando-se o mercúrio, o chumbo e os bifenis pliclorinados (PCBs), não há uma evidência clara de teratogenicidade causada por outros contaminantes ambientais, possivelmente devido a dificuldades metodológicas. Contrariamente ao que ocorre em experimentos com animais de laboratório, as pessoas são raramente expostas a um único contaminante potencialmente perigoso. Porém, a maioria das informações que documentam efeitos adversos secundários à contaminação ambiental na saúde reprodutiva são oriundas de exposição a somente um agente e há pouca informação disponível sobre de que maneira dois ou mais contaminantes ambientais podem afetar a gestação. Este artigo revisará as abordagens metodológicas utilizadas para se dispor de um acesso aos resultados adversos decorrentes da exposição aos poluentes e seus principais resultados.

Unitermos: Contaminantes ambientais; defeitos congênitos; teratogênese; abortos; natimortos; prematuridade.

Exposure to environmental contaminants during pregnancy and its effects in the fetal well-being: a review

Human exposure to environmental contaminants is omnipresent. A great concern about individuals who live near hazardous waste sites is the potential risk of adverse pregnancy outcomes, especially birth defects. Additionally, with the exception of mercury, lead and PCBs, there is not clear evidence of the teratogenicity caused by other environmental contaminants due to methodological difficulties. Unlike animal experiments, people are rarely exposed to a single hazardous contaminant. However, most of the information documenting adverse reproductive health effects from environmental contaminants originated from studies focused on exposure to single chemicals,

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos.

³ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos. Correspondência: Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos (SIAT), Rua Ramiro Barcelos 2350, 3º andar, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: siat@hcpa.ufrgs.br

and there is little information available on how two or more contaminants affect human pregnancies. This paper reviews the methodological approaches used to access the adverse outcomes of pregnancies exposed to environmental contaminants and its major results.

Key-words: Environmental contaminants; birth defects; teratogenesis; abortions; stillbirths; prematurity.

Revista HCPA 2001(3):368-378

Introdução

A contaminação ambiental, iniciada com a Revolução Industrial no século XVIII, tem aumentado progressivamente em todo o mundo e de maneira mais radical a partir da II Guerra Mundial. Os avanços tecnológicos nos últimos 40 anos resultaram em um acúmulo de resíduos tóxicos que proliferam a cada ano, à medida que vem aumentando a introdução de novos métodos e novos materiais nas indústrias (1). Sendo assim, a industrialização é o mais poderoso determinante da transformação ambiental, considerando-se que nos últimos 100 anos a produção industrial mundial aumentou cerca de 100 vezes (2).

Todas as nações industrializadas se deparam atualmente com problemas decorrentes da contaminação ambiental e os países em desenvolvimento, que estão em fase de industrialização, já podem também se confrontar com este problema. Para entender esta questão, basta saber que o lixo tóxico é o problema ambiental mais sério nos EUA, sendo estimado, de acordo com o *U.S. Government Accounting Office*, que há mais de 400 mil sítios ativos com resíduos tóxicos depositados, ao longo de minas, lagoas e depósitos de água (1,3). Como fator que aumenta a complexidade desta situação, uma estimativa de 1999 apontou que há cerca de 70 mil agentes químicos em uso nos EUA (4), com mais de 35 mil pesticidas registrados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), no mínimo 1.500 agentes químicos em cosméticos e cerca de 1.200 componentes em produtos domiciliares, além da contaminação industrial da água e de alimentos por mais de 700 tipos diferentes de compostos (3).

Os contaminantes ambientais podem ser substâncias naturais, tais como metais e materiais radioativos, ou podem ser produtos

industrializados. Assim como tais contaminantes podem ser manufaturados, eles também podem ser subprodutos produzidos não intencionalmente pela atividade humana, como no caso de produtos da combustão ou incineração, ou pela geração de clorofórmio pela clorinação da água potável. Muitos contaminantes são misturas de substâncias químicas relacionadas, como os hidrocarbonos policíclicos aromáticos, produtos do petróleo bruto e refinado e policloretos aromáticos (5).

O problema da contaminação ambiental associada a efeitos adversos na saúde da população tem sido objeto de numerosos estudos e constitui uma preocupação constante para os setores científicos, produtores e para a comunidade em geral. No que concerne aos efeitos dos agentes químicos frutos da contaminação ambiental, o termo *ecologia reprodutiva* foi criado para definir o estudo das causas e mecanismos dos fatores de risco ambientais sobre a saúde reprodutiva bem como dos métodos de prevenção e manejo dos potenciais efeitos adversos decorrentes destes (6).

A exposição humana a contaminantes ambientais não ocorre somente em indivíduos que vivem próximos a sítios poluentes ou apenas em pessoas de baixo nível sócio econômico que vivem em países em desenvolvimento, mas ela é considerada um problema global. Cada ser humano carrega uma certa quantidade de chumbo em seus ossos, mercúrio em seus cabelos e dioxinas e bifenis policlorinados em sua gordura corporal (5,7-10).

Adicionalmente, o desenvolvimento industrial progressivo, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil, muito rápido e não acompanhado de incrementos tecnológicos de biossegurança, também gera uma bioacumulação de várias substâncias

potencialmente tóxicas (9).

Há três principais vias através das quais o ser humano se encontra exposto a tais agentes químicos e físicos com potencial teratogênico e/ou carcinogênico e mutagênico (3):

1. em nível domiciliar (substâncias químicas utilizadas no lar, assim como exposição a fontes radioativas);
2. em nível ocupacional (agentes cujo contato se dá no cotidiano profissional);
3. em nível ambiental (através de exposição a contaminantes ambientais de depósitos de lixo tóxico, a própria poluição ambiental na água, ar e alimentos ou desastres).

Deste modo, a contaminação ambiental através dos poluentes industriais faz com que toda a população, e mais especificamente, a população de mulheres em idade reprodutiva, seja suscetível a tal exposição. Suspeita-se que a exposição crônica a poluentes ambientais, antes ou após a concepção, pode afetar a reprodução através de dano ou morte celular, os quais podem levar a infertilidade, perda fetal, retardo de crescimento intra-uterino e ocorrência de defeitos congênitos (11).

Tipos de efeitos adversos sobre a saúde reprodutiva

Estudos desenvolvidos em animais, com misturas de poluentes encontrados no meio ambiente, apesar de limitados, evidenciam um potencial teratogênico associado com fontes de água, apesar de não ter sido estabelecido uma relação causa-efeito precisa (12,13).

Os efeitos adversos teóricos, no que concerne à toxicidade dos agentes ambientais que podem ser detectados em humanos, variam em relação ao tempo no qual a substância inicia sua toxicidade e ao tipo de indivíduo que sofre a exposição. De um modo geral, a exposição a tais contaminantes causando alterações patológicas no desenvolvimento pode ocorrer ou no período pré-concepcional pela exposição dos pais, ou pela exposição materna durante a gestação ou diretamente para a prole no período pós-natal através da amamentação (5,14). (tabela 1).

Cabe ressaltar, porém, que as exposições a contaminantes ambientais, mesmo que por curtos períodos e em baixos níveis, podem comprometer sistemas fisiológicos com uma

maior significância em subpopulações mais sensíveis (isto é, crianças, mulheres em idade reprodutiva e em idosos). Em tais populações, os contaminantes podem iniciar alterações em mais baixos níveis em comparação com os demais. Alguns estudos recentes mostram associação entre exposições a baixos níveis de contaminantes ambientais e efeitos na saúde embrio-fetal, mais notadamente baixo peso e alterações imunológicas (15). Os fetos costumam ser mais atingidos do que os adultos pelos agentes tóxicos ambientais, dentre outros motivos, por causa da diferença no tipo de exposição e devido à imaturidade fisiológica que acarreta, entre outros resultados, baixos níveis de enzimas necessárias para a detoxificação fetal (16).

Defeitos congênitos e detecção de toxicidade ambiental: aspectos metodológicos

As alterações estruturais, isto é, malformações congênitas, têm um importante papel no estudo da toxicologia do desenvolvimento em humanos. A razão fundamental é que estas parecem ser um parâmetro mais sensível para se detectar a toxicidade química e muito mais acessível do que as anomalias funcionais. Porém, a facilidade de seu reconhecimento não significa necessariamente que as malformações congênitas sejam mais importantes do que outros parâmetros, tais como alterações neuro-comportamentais e retardo do crescimento intra-uterino (14).

Contudo, a acessibilidade de aferição de um parâmetro de saúde reprodutiva, como é a taxa de malformações congênitas, não significa que as inferências sobre o efeito dos contaminantes ambientais sobre a saúde embrio-fetal sejam realizadas facilmente e com a acurácia que é obtida em estudos experimentais. Em contraste com as condições controladas das investigações em animais de laboratório, humanos são tipicamente expostos a agentes químicos através das mais variadas vias. Um estudo típico de laboratório envolve a exposição controlada de animais experimentais a um único agente químico em uma rota única e por um específico período de tempo. Porém, as exposições experimentadas pelos seres humanos na vizinhança de sítios poluentes envolvem múltiplos agentes, múltiplas vias e padrões de exposição que diferem tipicamente

Tabela 1. Efeitos adversos relacionados a toxicidade de um agente ambiental

Tempo e tipo de indivíduo no qual a substância inicia a sua toxicidade	Exemplos de efeitos adversos no(a)
Toxicidade em adultos	Libido, comportamento, função endócrina, reprodução (gametogênese, tempo de vida reprodutiva, teratogênese para a prole futura)
Toxicidade Materna@toxicidade em recém-nascido/lactente (alteração da fisiologia e do metabolismo durante a gestação e lactação)	Suscetibilidade a toxinas, Qualidade e Quantidade do leite, acúmulo de metabólicos tóxicos no leite materno
Toxicidade no desenvolvimento@toxicidade direta embrio-fetal	
Pré-implantação e implantação	Fertilização, mobilização e sobrevivência da célula-ovo fertilizada
Desenvolvimento embriônico	Crescimento e diferenciação, organogênese, sobrevivência
Desenvolvimento da placenta	Crescimento
Desenvolvimento fetal	Crescimento e diferenciação, função de órgãos e de sistemas, sobrevivência, peso ao nascer
Desenvolvimento pós-natal	Funções imunes e endócrinas, Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Periférico, função Sexual, outras funções celulares (carcinogênese transplacentária), sobrevivência, função de outros órgãos e de sistemas

daqueles estudados na pesquisa toxicológica experimental. Tais exposições podem afetar populações de risco devido a elevadas concentrações, aumento da toxicidade resultante das interações de diferentes misturas complexas, assim como a suscetibilidade intrínseca individual do indivíduo (14).

Os estudos ecológicos são relativamente rápidos e fáceis de realizar, e os únicos considerados adequados para o estudo do impacto dos contaminantes ambientais na saúde da população. Entretanto, apesar destes formularem hipóteses sobre uma possível associação entre poluição e efeitos adversos, não podem provar a causa, porque os dados não são associados a pessoas individuais. Isto é, não há a informação de que um recém-nascido portador de uma determinada malformação congênita realmente foi exposto a determinado contaminante industrial, já que os dados foram

obtidos de uma amostra populacional (17).

Em termos de acesso aos possíveis efeitos adversos oriundos da exposição a agentes ambientais para o feto e/ou embrião expostos, os dados mais confiáveis e disponíveis advêm de estudos epidemiológicos realizados por programas de monitorização de defeitos congênitos. Tais sistemas de análises de defeitos congênitos emergiram após as tragédias da rubéola e da talidomida em 1960 a fim de monitorizar a ocorrência de defeitos congênitos e proverem sinais de alarme precoces após a introdução de agentes teratogênicos no ambiente (18). Atualmente 25 destes programas pertencem ao *International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems*, uma organização que permite conduzir estudos epidemiológicos e de monitorização de defeitos congênitos no mundo inteiro, detectando mudanças de prevalência ao nascimento de

defeitos morfológicos específicos que possam identificar a presença de substâncias teratogênicas e/ou mutagênicas para uma possível futura eliminação do ambiente (19,20). Faz parte desta rede de informações o Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC).

O ECLAMC é um programa de base hospitalar, iniciado em 1967 como um projeto de pesquisa dentro do Ministério da Saúde da Argentina e reconhecido pela Organização Mundial da Saúde como Centro Colaborativo para a Prevenção de Malformações Congênitas (Castilla & Orioli, 1983). Atualmente este programa de monitorização conta com cerca de 100 maternidades em doze países da América Latina, sendo todos os dez da América do Sul e mais a Costa Rica e a República Dominicana na América Central (Castilla & López-Camelo, 1990). No final de 1999, o ECLAMC estimou que dos 3.020.896 nascimentos monitorizados no período de 1982 a 1998, 80.967 malformações congênitas foram detectadas, perfazendo uma taxa de 2,7% de malformações (21).

Contaminantes ambientais e comprovação de teratogenicidade em seres humanos

Apesar de haver uma crença geral por parte da literatura leiga e da população de que todos os contaminantes ambientais causam defeitos congênitos, mais especificamente malformações congênitas, as estimativas científicas não apóiam esta idéia. Isto é, para a maioria dos poluentes industriais encontrados no ambiente não há evidências científicas de que estes causem malformações congênitas ou danos funcionais na prole exposta (19,22).

As revisões de literatura apóiam, portanto, a idéia de que o número de poluentes químicos teratogênicos comprovados ainda permanece muito limitado em comparação à quantidade de produtos industriais presentes (19). Somente 3 associações podem ser consideradas comprovadas em relação a poluentes e efeitos adversos que levam a defeitos congênitos estruturais ou funcionais: o metilmercúrio, o chumbo e os bifenis policlorinados, os quais agem preferencialmente sobre o sistema nervoso central do embrião ou feto, levando a retardo mental e/ou microcefalia. Deste modo, as demais exposições a contaminantes ambientais

químicos permanecem como apenas suspeitas ou apresentam resultados negativos.

O metilmercúrio (mercúrio orgânico), um resíduo da indústria de fertilizantes, foi lançado inicialmente em Kyushu, na baía de Minamata, no sul do Japão em 1952, e acumulou-se nos peixes que faziam parte da dieta da população local, resultando em sinais e sintomas neurológicos de grande magnitude nos adultos e crianças expostos. Adicionalmente, microcefalia, paralisia cerebral severa, dentição anormal (má oclusão, tamanho irregular dentário, alterações na coloração) estrabismo e nistagmo ocorreram nos fetos expostos entre o 6º e 8º mês de gestação (25). Entretanto, a associação entre estas anormalidades e o metilmercúrio somente foi feita em 1959, recebendo a designação de doença de Minamata, a qual foi relatada no distrito de Niigata, na área continental do Japão em 1964 e em vários outros países, incluindo os EUA (Novo México), Iraque, Suécia e a antiga URSS. Em todos os casos, a exposição ao metilmercúrio pelas gestantes se deu através da cadeia alimentar e a casuística total foi em torno de 65 casos (3).

No que concerne ao chumbo, apesar deste ser considerado menos tóxico do que o mercúrio, ele parece ter implicações maiores para gerações futuras, pelo fato de ser mais amplamente distribuído, ter um efeito tóxico cumulativo e efeitos mais sutis. Está bem estabelecido que o chumbo cruza a placenta já entre a 12ª a 14ª semanas de vida gestacional, sendo que a concentração deste agente no cordão umbilical é similar à materna. Pelo fato do chumbo não ser facilmente excretado, ele pode se acumular em todos os tecidos fetais, particularmente o cérebro fetal, levando a uma diminuição das conexões neuronais e atraso na migração neuronal. Isto, por sua vez, explica os achados encontrados em três estudos epidemiológicos, os quais relacionam a exposição intra-uterina ao chumbo com retardo no desenvolvimento neuro-psico-motor precocemente. Adicionalmente, a exposição a este metal também foi associada com um aumento significativo na taxa de abortamentos, natimortalidade, prematuridade, diminuição no crescimento pós-natal e aumento na taxa de malformações menores (3).

Os bifenis policlorinados (PCBs) também foram identificados como teratogênicos humanos através da exposição acidental, primeiramente como resultado da contaminação de óleo de

arroz em uma área do Japão, resultando na doença de Yusho em adultos e em sua prole. Os recém-nascidos expostos intra-útero apresentavam uma peculiar pigmentação marrom e anomalias esqueléticas menores e casos adicionais foram relatados mais tarde no Japão e em Taiwan (onde foram conhecidos como doença de Yusheng), resultantes da mesma contaminação (26). Cerca de 165 casos foram reconhecidos como decorrentes desta exposição e estudos de *follow-up* realizados *a posteriori* evidenciaram déficits intelectuais de gravidade variável nestas crianças (3, 26).

Dado os numerosos casos de malformações atribuídos às medicações, a experiência com os agentes químicos ambientais é pequena, mas tendendo a uma maior probabilidade de induzirem malformações, devido ao fato dos contaminantes terem um número muito maior e uma distribuição mais ampla do que os fármacos. Assim, outros contaminantes ambientais podem ser vistos como suspeitos de teratogenicidade, como os bifenis polibrominados, o ácido 2,4,5-triclorofenóxi – acético (TCDD) e outras dioxinas, monóxido de carbono, solventes, sendo os seus efeitos ainda avaliados e não comprovados para teratogenicidade (3).

Estudos mundiais

De um modo geral, os estudos encontrados na literatura no que concerne à exposição a contaminantes ambientais e o seu efeito na saúde embrio-fetal podem ser agrupados em dois métodos. O primeiro abrange estudos nos quais se investigam comunidades localizadas perto de uma única e específica fonte de contaminação (estudos de sítio único) e o segundo em estudos nos quais são focalizadas várias comunidades expostas a várias fontes de exposição (estudos de sítios múltiplos) (22). A maioria dos estudos é baseada na primeiro método (tabela 2), sendo que há poucas análises baseadas na segunda metodologia (tabela 3).

As investigações de sítios únicos de exposição, isto é, relacionadas a uma específica e única fonte de exposição a contaminantes ambientais, tornam-se de grande importância como uma resposta às preocupações da comunidade. Contudo, elas apresentam como

um viés importante o fato de que há uma publicação preferencial de resultados positivos. Adicionalmente, o tamanho da população, em alguns destes estudos, é geralmente pequeno, podendo limitar seriamente o poder estatístico de uma análise se o efeito adverso a ser investigado for raro (que é o caso das malformações congênitas) (22) (tabela 2) (15,22-30).

No que concerne aos estudos de sítios múltiplos de exposição a contaminantes ambientais, estes, além de estarem crescendo em número, apresentam a vantagem de contarem com números amostrais maiores, o que aumenta o poder estatístico para detectar aumento no risco de eventos raros, como as malformações congênitas. Estas análises em grande escala, porém, tornam o acesso às fontes de exposição mais complicado do que os estudos de sítio único, já que a informação adequada precisa ser obtida de vários sítios. Outro problema, que se refere aos dois tipos de delineamento citados por Vrijheid (22), é que a maioria dos estudos não é capaz de distinguir entre diferentes tipos e vias de contaminação e, na ausência de melhores dados de exposição, baseia a avaliação da exposição, de modo não-individual, na distância das residências dos sítios de contaminantes. Deste modo, uma classificação errônea da exposição, se não for diferenciada das outras, pode levar a uma subestimativa dos resultados positivos (tabela 3) (31-38).

Estudos na América Latina

A situação regional ecológica em nosso meio pode ser de risco, já que os países da América do Sul são sociedades industrializadas, porém subdesenvolvidas, e os seus avanços tecnológicos industriais são incorporados sem os suficientes elementos de proteção da população à contaminação ambiental (19). Particularmente em relação ao Brasil, o problema da poluição ambiental atinge dimensões alarmantes, exigindo a adoção de medidas urgentes no que concerne à minimização dos riscos à saúde reprodutiva da população (39). Como fator agravante, há muito menos estudos conduzidos em tais países do que nos desenvolvidos. Contudo, estes permitem inferir os achados anteriores, isto é, da quase ausência de resultados causa-efeito positivos (tabela 4) (19,40-41).

Tabela 2. Contaminações ambientais de sítio único

Contaminante	Local	Efeito suspeitado	Comprovação
ACIDENTES			
Radiação	Hiroshima, 1945	Microcefalia, retardo mental	SIM
Radiação	Bikini, 1954	Malformações	Não
Radiação	Winscale, 1957	Microcefalia, retardo mental	SIM
Radiação	3 Mile Isl., 1979	Microcefalia, retardo mental	SIM
Radiação	México, 60Co	Malformações	Não
Radiação	Chernobyl, 1986	Mutagênese	Não
Radiação	Chernobyl, 1986	Malformações	Não
Radiação	Chernobyl, 1986	Malformações	Não
Dioxina (TCDD)	Seveso, 1976	Malformações	Não
Dioxina (TCDD)	Vietnam	Malformações	Não
Gás mostarda	Teerã	Lábio leporino	Não
CRÔNICOS			
Industriais			
Vários	Polônia	Malformações	Não
Vários	New Jersey	Baixo peso e prematuridade	SIM
Vários	Montreal	Baixo peso e prematuridade	SIM
Chumbo (fundição)	Kosovo	Retardo mental	SIM
Chumbo	Canárias	Retardo mental	não
Chumbo	Canárias	Malformações	não
Dioxina (TCDD)	Missouri	Nenhum	não
Bifenis policlorinados (PCBs)	Japão, Taiwan	Malformações congênicas	SIM
		Alterações tóxicas na prole	não
Petroquímica	Suécia	Malformações	não
Cloreto de Vinil	Shawinigan, Canadá	Malformações	não
Cloreto de Vinil	Vários	Aborto	não
Manganês	Grote Eylandt, Áustria	Malformações	não
Zinco ungueal	USA	Defeitos de tubo neural	não
Dejetos industriais	Love Canal	Malformações	não
Agropecuários		Lábio leporino	não
Pesticidas	Coffs-Harbour	Malformações	SIM*
Pesticidas	Teckomatorp, Suécia	Abortos em gemelares	não
Pesticidas	Califórnia	Amputações	SIM
Metilmercúrio	Minamata	Retardo mental e paralisia cerebral	não
Metilmercúrio	Pão, trigo, Iraque	Malformações	SIM
		Paralisia cerebral	não
Triclorfon	Rinyazsenkiralı	Malformações	não
Hexaclorobenzeno, fungicida	Turquia	Hirsutismo	não
Outros			não
Alta tensão	Vários	Malformações	não
Radiação natural	Natural, vários	Síndrome de Down	não
Nitratos	Água, Inglaterra	Defeitos de tubo neural	não
Dibromocloropropano	Água, Califórnia	Malformações	não
Alumínio	Água, Inglaterra	Pé torto congênito	não
Triometano (THM)	Água, Carolina do Norte;	Malformações, abortamento	
	Água, Atlanta		não
Fluor	Água potável	Síndrome de Down	SIM*
Arsênico	Água potável	Coartação de aorta	não
Selênio, mercúrio e chumbo	Água potável	Malformações congênicas	SIM*
Tricloroetileno (TCE)	Água potável	Cardiopatas congênicas	não
Tricloroetileno (TCE)	Água potável	Malformações congênicas	SIM*
Tricloroetileno (TCE) e Dicloroetileno (DCE)	Água potável	Cardiopatia congênita	

Tabela 3. Contaminações ambientais de sítio múltiplo classificadas segundo o seu modo de ocorrências, efeitos suspeitados e comprovação

Delineamento do estudo/autores	Objeto de estudo	Medida de exposição	Efeito suspeito	Resultado
Caso-controle/ Shaw et al., 1992 (31)	300 sítios / 5.046 RN com MC vs 28.085 C	Residência no sítio de potencial exposição	MC	CC: 1,5 vezes maior
Caso-controle/Sosniak et al., 1994 (32)	1281 sítios/17.407 nascimentos	Residência dentro de uma milha dos sítios	MC, MF, BP	Sem associação
Caso-controle/ Geshchwind et al., 1992 (33)	590 sítios em Nova Iorque/9.313 RN com MC /17.802 C	Residência dentro de uma milha dos sítios de exposição	MC	12% aumento,
Caso-controle/Croen et al., 1997 (34)	105 sítios de contaminação e 596 sítios sem contaminação na Europa/507 casos de DTN ;210 CC/439 FO e 455 C	Residências dentro de 1 milha e de 4 milhas	DTN, CC,FO	Sem associação significativa
Caso-controle/Dolk et al., 1998 (35)	21 sítios em 5 países da Europa/ 1.089 RN com MC; 2366 C	Residência dentro de 3km	MC	Aumento em 33% DTN e CC.
Coorte transversal/ Bhopal et al., 1999 (36)	19 sítios expostos/ 8 sítios controles	Residência de acordo com o censo no sítio de potencial exposição	MC, BP,PF	Sem associação
Caso-controle/Marshall et al., 1993 (37)	643 sítios/473 casos DSNC; 3.305 casos de defeitos músculo-esqueléticos; 12.436 controles	Dentro de uma milha para cada sítio	DSNC e músculo-esqueléticos	Nenhuma associação
Ecológico transversal/ López-Camelo et al., 2000 (38)	614.796 nascimentos	Atividade industrial versus malformação específica	anencefalia e microcefalia	associação positiva para indústrias têxteis e indústria automotiva, respectivamente

RN: recém-nascido; MC: malformações congênitas; C: recém-nascidos controles; DTN: defeitos de tubo neural; DSNC: defeitos de Sistema Nervoso Central; CC: cardiopatia congênita; BP: baixo peso.

Conclusões

Os efeitos do metilmercúrio, dos bifenis policlorinados e do chumbo sobre a saúde embrio-fetal tiveram ampla repercussão na opinião pública e nos meios científicos,

evidenciando de maneira inequívoca que a exposição durante a gestação aos contaminantes ambientais químicos podem produzir alterações no desenvolvimento embrio-fetal. Entretanto, para a maioria dos demais agentes químicos lançados diariamente no

Tabela 4. Situação regional sul-americana

Contaminante	Lugar	Efeito (suspeita)	Confirmação
Malathion	Viña del Mar, 1982, Chile	Malformações, abortos espontâneos, natimortos	Não
Terremoto	Santiago, 1985, Chile	Lábio leporino	SIM
Radiação	Goiânia, 1997; 137Cs, GO	Malformações	Não
Chumbo	Caçapava, SP	Anencefalia	Não
Benomyl	América do Sul	Anoftalmia	Não
Industrial	Cubatão, SP	Anencefalia	Não
Carvão	São Jerônimo, RS	Malformações congênitas	Não
Indústrias petroquímica	Montenegro	Malformações congênitas	Não
Poluição costeira	América do Sul	Amputação de membros	Não

19, 40-41

ambiente pelas indústrias, os dados de seus efeitos sobre a saúde reprodutiva são limitados, principalmente devido a dificuldades inerentes à metodologia empregada para a detecção de parâmetros fidedignos de saúde embrio-fetal. Deste modo, são necessárias novas abordagens no que concerne aos estudos ecológicos, com números amostrais mais extensos e, preferencialmente, com o amparo de sistemas de monitorização de nascimentos.

Referências

- Ladou J, Jackson RI, Howard J. Environmental exposures and controls. In: LaDou J, editor. Occupational and environmental medicine. Stanford: Appleton & Lange; 1997. p. 375-80.
- Clark W. Managing planet earth. *Scient Am* 1989;269(10):47-54.
- Schardein JL. Chemical exposure in pregnancy. In: Schardein JL, editor. Chemically induced birth defects. New York: Marcell Dekker Inc; 1993. p. 659-74.
- U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.oaspub.epa.gov>; 1999.
- Carpenter Do, Arcaro Kf, Bush B, Niemi Wd, Pang S, Vakharia DD. Human health and chemical mixtures: an overview. *Environ Health Perspect* 1998;106(Suppl 6):1263-70.
- Bajaj JS, Misra A, Rajalakshimi M, Madan R. Environmental release of chemicals and reproductive ecology. *Environ Health Perspect* 1993;101(Suppl 1):125-30.
- Bruhn CG, Rodríguez AA, Barrios C, Jaramillo VH, Gras NT, Becerra J, et al. Mercurio en el cabello de embarazadas y madres lactantes chilenas. *Bol Oficina Sanit Panam* 1995;119(5):405-14.
- Goyer RA. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. *Environ Health Perspect* 1996; 104(10):1050-4.
- Romieu I, Lacasana M, McConnel R. The Lead Research Group Of The Pan-American Health Organization. Lead exposure in Latin American and the Caribbean. *Environ Health Perspect* 1997;105(4):398-405.
- Vartiainen T, Jaakkola Jjk, Saarikoski S, Tuomisto J. Birth weight and sex of children and the correlation to the body burden of PCDDs/PCDFs and PCBs of the mother. *Environ Health Perspect* 1998;106(2):61-6.
- Hemminki K, Saloniemi I, Luoma K, Salonen T, Partunen T, Vainio K. Transplacental carcinogens and mutagens: childhood cancer, malformations and abortions as risk indicators. *J Toxicol Environ Health* 1980;6:1115-25.
- Burkhart JG, Helgen JC, Fort DJ, Gallagher K, Bowers D, Propst TI, et al. Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog

- deformities. *Environ Health Perspect* 1998;106(12):841-8.
13. Burkhart JG, Ankley G, Bell H, Carpenter H, Fort D, Gardiner D, et al. Strategies for assessing the implications of malformed frogs for environmental health. *Environ Health Perspect* 2000;108(1):83-90.
 14. Hansen H, De Rosa CT, Pohl H, Fay M, Mumtaz MM. Public health challenges posed by chemical mixtures. *Environ Health Perspect* 1998;106(Suppl 6):1271-9.
 15. Berry M, Bove F. Birth weight reduction associated with residence near a hazardous waste landfill. *Environ Health Perspect* 1997;105(8):856-61.
 16. Perera FP, Jedrychowski W, Rauh V, Whyatt RM. Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environ Health Perspect* 1999;107(Suppl 3):51-460.
 17. Jeckel JF, Elmore J, Katz DL. Delineamentos comuns de pesquisa usados em Epidemiologia. In: Jeckel JF, Elmore JG, Katz DL, editors. *Epidemiologia, Bioestatística e Medicina Preventiva*. Porto Alegre: Artes Médicas. p. 80-7.
 18. Monteleone-Neto R, Castilla EC, Lopez-Camelo JS. Reconhecimento do efeito teratogênico sobre o homem. In: Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R, editors. *Mutagenese, teratogenese e carcinogenese: métodos e critérios de avaliação*. Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética; 1988. p.197-271.
 19. Castilla EE, López-Camelo JS, Paz JE, Orioli IM. Medio ambiente: contaminación y accidentes. In: Dutra MG, editor. *Prevencion primaria de los defectos congenitos*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1996. p.115-29.
 20. Khoury MJ. Commentary: contributions of epidemiology to the study of birth defects in humans. *Teratology* 1995;52:186-9.
 21. ECLAMC - Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas. Documento Final-XXXI ECLAMC, Florianópolis-SC, 1999.
 22. Vrijheid M. Health effects of residence near hazardous waste landfill sites: a review of epidemiologic literature. *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 1):101-12.
 23. Zierler S, Theodore M, Cohen A, Rothman KJ. Chemical quality of maternal drinking water and congenital heart disease. *Int J Epidemiol* 1988;17(3):589-94.
 24. Kallén B, Thorbert G. A study of pregnancy outcome in a small area around a chemical factory and a chemical dump. *Environ Res* 1983;37:313-9.
 25. Clarkson TW. Mercury: major issues in environmental health. *Environ Health Perspect* 1992;100:31-8.
 26. Sweeney AM. Reproductive epidemiology of dioxins. In: Schecter (ed)-*Dioxins and Health*. New York: Plenum Press; 1994. p. 549-85.
 27. Savitz DA, Andrews KW, Pastore L. Drinking water and pregnancy outcome in Central North Carolina: source, amount and trihalomethane levels. *Environ Health Perspect* 1995;103(6):592-6.
 28. Myers GI, Davidson PW. Prenatal methylmercury exposure and children: neurologic, developmental and behavioral research. *Environ Health Perspect* 1998;106(suppl 3):841-7.
 29. Johnson PD, Dawson BW, Goldberg SJ. A review: trichloroethylene metabolites: potential cardiac teratogens. *Environ Health Perspect* 1998;106(suppl 4):995-9.
 30. Castronovo FPJR. Teratogen update: radiation and Chernobyl. *Teratology* 1999;60:100-6.
 31. Shaw G, Shulman J, Frish JD, Cummins SK, Harris JA. Congenital malformations and birthweight in areas with potential environmental contamination. *Arch Environ Health* 1992;47(2):147-54.
 32. Sosniak WA, Kaye WE, Gomez TM. Data linkage to explore the risk of low birthweight associated with maternal proximity to hazardous waste sites from the National Priorities List. *Arch Environ Health* 1994;49:251-5.
 33. Gershwind SA, Stolwijk JAJ, Braken M, Fritzgerald E, Stark A, et al. Risk of congenital malformations associated with proximity to hazardous waste sites. *Am J Epidemiol* 1992;135:1197-207.
 34. Croen LA, Shaw GM, Sanbonmatsu L, Selvin S, Buffler PA. Maternal residential proximity to hazardous waste sites and risk of selected congenital malformations. *Epidemiology* 1997;8:347-54.
 35. Dolk H, Vrijheid M, Armstrong B, Abramsky L, Bianchi F, et al. Risk of congenital anomalies near hazardous-waste landfill sites: the Eurohazcon study. *Lancet* 1998;352:423-7.
 36. Bhopal RS, Tate JA, Foy C, Moffatt S, Phillimore PR. Residential proximity to industry and adverse birth outcomes. *Lancet* 1999;354:920-1.
 37. Marshall EG, Gensburg LI, Deres DA, Geary NS, Cayo MR. Maternal residential exposure to hazardous wastes and risk of Central Nervous System and musculoskeletal birth defects. *Arch Environ Health* 1997;47(2):147-54.
 38. Castilla EE, Campaña H, López-Camelo JS, ECLAMC ECOTERAT GROUP. Economic activity and congenital anomalies: an ecologic study in

- Argentina. *Environ Health Perspect* 2000;108(3):193-7.
39. Bortoletto ME. Impactos atuais das substâncias tóxicas sobre o meio ambiente, a saúde humana e demais seres vivos. In: Fundação Oswaldo Cruz, editor. *Tóxicos, civilização e saúde. Contribuição à análise dos sistemas de informações tóxico-farmacológicas no Brasil*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Informação Científica e Tecnológica, Núcleos de Estudos em
- Ciência e Tecnologia; 1993. p.13-28.
40. Leite JC, Schüler-Faccini L. Congenital defects in a coal mining region. *Rev Saúde Pública* 2001;35:136-41.
41. Minussi L. Fatores de risco para malformações congênitas, baixo peso ao nascimento e perdas gestacionais na população do município de Montenegro [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.

Terapia gênica: uma nova estratégia para o tratamento de doenças

Cláudia D. da Silva^{1,2}, Úrsula da Silveira Matte^{3,4},
Roberto Giugliani^{3,5}

A terapia gênica está baseada no conceito de que uma doença genética pode ser corrigida pela substituição ou adição do gene defeituoso. Muita expectativa foi gerada pelos primeiros protocolos, mas o surgimento de complicações inesperadas levou a uma diminuição do entusiasmo inicial. Neste artigo, é feita uma revisão dos diferentes tipos de vetores utilizados para terapia gênica, com discussão das suas vantagens e desvantagens. Além disso, as estratégias para alguns dos principais tecidos alvo são discutidas. Especial ênfase é dada às estratégias para o tratamento do câncer, área na qual atualmente se concentram a maioria dos protocolos clínicos e que apresenta dificuldades menores do que as envolvidas no tratamento de doenças monogênicas.

Unitermos: Terapia gênica; vetores virais; vetores não virais; câncer.

Gene Therapy: a new strategy for the treatment of diseases

Gene therapy is based on the simple concept that a genetic disease can be corrected by replacing the defective gene. Early trials encountered unforeseen complications and much of the initial enthusiasm dismayed. This paper is a review about different kinds of vectors, their advantages and disadvantages. Strategies for different target tissues is also discussed. Special interest is on strategies for the treatment of cancer, since nowadays this is the area of most clinical trials. The reason is that cancer treatment proved less complex than treatment of monogenic life-treating disorders.

Key-words: Gene therapy; viral vectors; non-viral vectors; cancer.

Revista HCPA 2001(3)379-386

Introdução

O termo terapia gênica pode ser definido como a transferência de material genético para dentro das células de um indivíduo com o objetivo

de conferir um benefício terapêutico. O princípio da terapia gênica baseia-se no entendimento de que um gene ou vários genes estão defeituosos ou mutados. Este defeito acarreta a produção descontrolada ou a supressão de uma proteína

¹ Laboratório Central de Saúde Pública, Secretaria da Saúde do RS.

² Universidade Luterana do Brasil.

³ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁴ Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁵ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

essencial para o funcionamento normal das células. A terapia gênica é a esperança de tratamento de um grande número de doenças até hoje consideradas incuráveis por métodos tradicionais.

O primeiro protocolo clínico foi desenvolvido por French Anderson e sua equipe em 1990, para o tratamento de uma imunodeficiência grave causada pela ausência da enzima adenosina deaminase. O protocolo envolveu a retirada de células da medula óssea da paciente que foram infectadas com retrovírus modificado, contendo o gene de interesse (ADA), e a seguir foram re-introduzidas no organismo. A primeira paciente tratada com essa abordagem apresentou uma significativa melhora dos sintomas gerados pela doença (1).

A euforia inicial sobre as aplicações rápidas da terapia gênica, entretanto, foi gradualmente sendo substituída por cautela e pela constatação de que o desenvolvimento efetivo da terapia gênica é tecnicamente muito mais exigente do que originalmente antecipado. As pesquisas nessa área encontram-se atualmente em fase de aperfeiçoamento técnico. Duras lições foram aprendidas ao longo de 10 anos de estudo, desencadeando a proposição de novos rumos, e o sentimento de que houve grandes ensinamentos, principalmente nas pesquisas básicas de muitas doenças. Os cientistas têm trabalhado muito no sentido de tentar aprimorar os vetores de expressão hoje existentes, de maneira a aumentar a eficiência da transferência

e dos níveis de expressão gênica, além de diminuir a imunogenicidade causada por alguns.

Atualmente, existem aproximadamente 450 protocolos clínicos de terapia gênica em andamento (2). A tabela 1 mostra o amplo espectro de doenças para as quais estão sendo desenvolvidos estudos clínicos, juntamente com o número de protocolos e o número de pacientes envolvidos. Aproximadamente 2/3 dos protocolos estão direcionados para o tratamento do câncer e muitas das doenças restantes, como as monogênicas e as infecciosas, estão voltadas, respectivamente, para o tratamento de fibrose cística e HIV.

Métodos de transferência

Basicamente três métodos de transferência gênica foram desenvolvidos: vetores virais, vetores não virais e métodos físicos. Os métodos físicos mais importantes envolvem microinjeção e eletroporação dos vetores plasmídias (DNA nu).

Vetores não virais

Os DNAs contendo genes terapêuticos podem ser introduzido nas células, utilizando-se vesículas fosfolipídicas sinteticamente produzidas, chamadas de lipossomos. A composição dessas moléculas assemelha-se à da membrana celular. Os lipossomos, portanto, criam uma via de passagem dos genes para dentro da célula. Os genes transferidos por

Tabela 1. Doenças, número de protocolos e número de pacientes envolvidos em estudos clínicos de terapia gênica

Doença	n protocolos	n pacientes
Câncer	331	2.361
Doenças monogênicas	71	309
Doenças infecciosas	36	408
Doenças cardiovasculares	36	59
Outras	8	19
Total	482	3.156

www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical

vetores não virais se integram facilmente em cromossomos de células em cultura de laboratório, mas esse fenômeno ocorre raramente *in vivo*. Essas moléculas lipídicas são fáceis de serem produzidas, são seguras, não provocam reações imunológicas e podem abrigar DNAs com tamanhos de até 48 Kb. Apesar dessas vantagens, apresentam uma baixa eficiência de transferência *in vivo* e podem ser destruídas por nucleases celulares (3).

Vetores virais

A maioria dos protocolos, entretanto, utilizam vetores virais (2). Muitos tipos de vírus foram adaptados para servir como vetores de transferência gênica. Os vetores virais mais utilizados em terapia gênica são: retrovírus, adenovírus e vírus adenoassociado. Esforços substanciais têm sido empregados no desenvolvimento dos poxivírus e do vírus herpes simples. A tabela 2 mostra tipos de vetores e número de protocolos que os empregam.

A utilização de vírus como vetores apresentam as maiores vantagens e também as maiores desvantagens para terapia gênica. Dentre as vantagens, pode-se salientar o fato de serem vetores naturais de transferência de genes e que resistem à degradação. Possuem, entretanto, maior potencial para induzir uma resposta imune, sendo considerados mais prejudiciais ao organismo.

Tabela 2. Tipos de vetores usados em terapia gênica e número de protocolos

Vetores	n protocolos
Retrovírus	204
Adenovírus	136
Lipofecção	068
DNA nu	045
Poxivírus	034
Adenoassociado	010
Biobalística	005
Transferência de RNA	005
Herpes simples	003
Total	510

www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical

Os vírus utilizados em terapia gênica são modificados para que percam sua capacidade replicativa. Eles são produzidos em cultura de células especializadas, chamadas de células empacotadoras. Essas são células especificamente criadas para prover as funções removidas do vírus selvagem, empacotando o vetor viral com as proteínas capazes de infectar a célula uma única vez. As células empacotadoras possuem os genes *gag*, *env* e *pol* inseridos estavelmente em diferentes regiões de seus cromossomos, o que assegura que a recombinação desses genes seja improvável. O cuidado na produção dos vírus empacotados por essas células é essencial para que não resgatem a habilidade de criar novas partículas virais infectivas (4).

Os vetores retrovirais são os mais bem estudados e podem infectar até 100% de células em cultura que estão em divisão. Os retrovírus são vírus dupla fita de RNA que replicam após integração do material genético no genoma hospedeiro. Antes do retrovírus ser utilizado como vetor, os genes *gag* (codifica proteínas estruturais internas), *pol* (codifica a transcriptase reversa) e *env* (codifica o envelope viral formado por glicoproteínas), que perfazem 80% de seu genoma, são retirados e substituídos pelo gene terapêutico e por um gene que permite a seleção das células transfectadas. Desta maneira, um vírus selvagem é convertido em um vetor de terapia gênica seguro. A principal vantagem do emprego de vetores retrovirais está relacionada com a capacidade de integrarem seus genes no cromossoma da célula hospedeira, possibilitando a manutenção da expressão gênica por longo tempo. Entretanto, essa integração é ao acaso, o que pode interromper um gene essencial ou mesmo ativar um oncogene. A chance de ocorrência de mutagênese insercional é baixa, mas não deve ser descartada. Além disso, infectam somente células em divisão. Essa "limitação" tem sido explorada na terapia gênica para o câncer, permitindo a infecção específica das células tumorais que apresentam uma taxa de divisão muito maior do que as células normais.

Até pouco tempo o vetor retroviral mais bem estudado em terapia gênica era de origem murina, o MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*), que possui um genoma relativamente

simples. Recentemente, o mais novo membro da família dos retrovírus que tem sido explorado para uso em terapia gênica é o HIV, classificado como um lentivírus.

A manipulação de vetores derivados no HIV abriu novas perspectivas para o tratamento de uma ampla variedade de doenças, uma vez que possuem a capacidade de infectar tanto células em divisão quanto células que não se dividem. Esse tipo de vetor tem apresentado bons resultados em estudos pré-clínicos, com expressão sustentada e sem estimular o sistema imune. O genoma do HIV é considerado o mais complexo dentro da família dos retrovírus. Além dos genes *gag*, *pol* e *env* existem ainda genes que codificam as proteínas *Vpr*, *Vif*, *Vpu*, *Nef* e *Tat*, todas cruciais para a virulência do HIV. Esses genes podem ser retirados, sem alterar a performance do vírus, de modo que o vetor possua mínimas seqüências do vírus selvagem. Uma das recomendações no uso de vetores derivados de HIV é que se utilize proteínas heterólogas para o “encapsidamento” do vetor, ou seja, proteínas estruturais de outros tipos virais. O uso das proteínas heterólogas aumenta o tropismo do vetor pelo tecido e torna impossível a geração de vírus selvagens durante a produção do vetor nas células empacotadoras (5). Em um estudo utilizando vetores lentivirais para tratamento de fibrose cística foi possível observar que a incorporação no envelope de proteínas G, derivadas do vírus da estomatite vesicular, aumentou o tropismo do vetor às células do pulmão. Além disso, experimentos em camundongos também demonstraram altos níveis de transdução do gene CFTR utilizando-se essa abordagem (6).

Os vetores adenovirais são construídos com base nos adenovírus humanos, cujo material genético é formado por DNA. A maioria dos adenovírus selvagens apresenta as seguintes características: não causam doenças sérias, possuem a capacidade de carregar genes terapêuticos de tamanho grande e infectam células que não estão em divisão. Entretanto, os genes podem funcionar transitoriamente, pois são vetores que não se integram ao cromossoma da célula hospedeira, permanecendo no núcleo sob a forma de episômos (livres). Além disso, são altamente imunogênicos (5).

Os vetores adenoassociados (AAV) pertencem à família dos parvovírus e não causam

doenças humanas conhecidas. Combinam as principais vantagens desenvolvidas pelos adenovírus e retrovírus, pois infectam, tanto células em divisão, como células quiescentes. Além disso, podem integrar seus genes no cromossomo das células hospedeiras. O vírus selvagem possui tropismo pelo cromossomo 19 humano (5). Esse vetor foi empregado no tratamento da hemofilia B em modelos animais, demonstrando expressão estável do fator IX de coagulação e níveis eficientes de transdução (7). Sua principal desvantagem está relacionada com a capacidade de carregar apenas genes terapêuticos pequenos.

Os vírus herpes simples (HSV) são capazes de carregar genes para dentro de células nervosas, pois possuem tropismo pelo sistema nervoso central. Entre suas propriedades estão a habilidade de infectar células em divisão ou quiescentes, a capacidade de incorporar múltiplos genes terapêuticos e o fato de normalmente não integrarem seus genes nas células hospedeiras. O principal impedimento para o efetivo uso do HSV como vetor está na toxicidade residual das formas não replicantes. Além disso, provocam resposta imune, assim como os adenovírus (5).

A produção de vetores deve seguir normas rígidas de controle de qualidade e de biossegurança. Durante esse processo, é essencial que não existam partículas infecciosas, no caso do emprego de vetores virais, e que sejam realizados testes de integridade dos plasmídios, contendo o gene de interesse. É importante que o vetor escolhido não perturbe o funcionamento normal da célula e que as alterações provocadas sejam resultado somente da expressão do gene terapêutico (4). A escolha do tipo de vetor é freqüentemente ditada pela necessidade de uma expressão por um período duradouro ou transitório, bem como das características do tecido alvo. Finalmente, é importante salientar que não dispomos de um vetor ideal, todos os que estão em estudo apresentam vantagens e desvantagens.

Estratégias e tecidos alvo

Até agora, todos os estudos clínicos em andamento têm utilizado a estratégia da adição gênica em vez da correção ou troca de um gene defeituoso, sendo esta última tecnicamente mais difícil. Duas outras abordagens têm sido bastante

utilizadas em terapia gênica, o RNA *antisense* e as ribozimas. Os RNAs *antisense* possuem seqüências complementares a um RNA específico e, por isso se ligam a ele, bloqueando a tradução de uma proteína (8). Já as ribozimas são moléculas de RNA catalíticas que se ligam ao RNA alvo de maneira sítio-específica, provocando a dissociação desse último. As ribozimas são moléculas capazes de degradar diferentes RNAs alvo (9). Assim como os RNA *antisense*, as ribozimas também possuem seqüências complementares ao RNA alvo da degradação. Esses RNAs catalíticos são naturalmente encontrados dentro das células desempenhando funções como: processamento do RNA, maturação do tRNA e degradação de RNAs defeituosos. Alguns protocolos clínicos utilizam essa abordagem para combater o vírus HIV. A transferência de ribozimas altera a expressão gênica do HIV, prevenindo sua disseminação. As ribozimas também têm sido utilizadas experimentalmente no tratamento da hepatite C (10).

Atualmente, todos os protocolos clínicos aprovados envolvem a transferência de genes somente a células somáticas, já que o uso de células germinativas é objeto de consideráveis debates éticos (11). A transferência gênica para células somáticas pode ocorrer tanto *ex vivo*, como *in vivo*. A abordagem *ex vivo* é a mais freqüente e envolve a remoção de células dos pacientes, adição do vetor desejado em laboratório, e o retorno das células corrigidas ao paciente.

A escolha do tecido alvo é um dos pontos mais importantes a ser considerado no desenho de um protocolo de terapia gênica. O tecido alvo deve estar envolvido na sintomatologia da doença, ser acessível e compatível com o método de transferência gênica escolhido.

O trato respiratório é o tecido alvo para o tratamento de câncer de pulmão, fibrose cística e deficiência de alfa-1-anti-tripsina (12). Os principais vetores utilizados são adenovírus, AAV e lipossomos. Um dos principais inconvenientes do uso de vetores adenovirais e adenoassociados se deve ao surgimento de resposta imunológica. As células pulmonares, na sua maioria, não se dividem, portanto, o emprego de vetores retrovirais não é aconselhável.

A realização de terapia gênica para doenças que afetam o SNC representa um

grande desafio, por diferentes razões. Em primeiro lugar, a maior parte dos vetores existentes é incapaz de cruzar a barreira hematoencefálica. Em segundo, o SNC compreende uma grande variedade de tipos celulares altamente diferenciados e que desempenham diferentes funções, sendo que certas doenças podem estar mais ligadas a uma área, enquanto outras são difusas. Outra dificuldade é que são células que não se dividem, sendo refratárias aos retrovírus. Além disso, não se obtém com facilidade um número suficiente de células nervosas para crescimento em cultura. Ainda assim, várias estratégias de transferência gênica têm sido propostas para o tratamento de doenças com envolvimento neurológico. Entre elas estão a injeção direta do vetor por estereotaxia (trepanação), uso de vetores derivados de herpes vírus (HSV) e tentativa de modificação de outras células, como macrófagos. Esses últimos são capazes de migrar até cérebro e corrigir o defeito gênico. Protocolos experimentais para o tratamento de doenças como Alzheimer, Parkinson e outras doenças neurodegenerativas, têm utilizado as técnicas descritas acima (13).

A possibilidade de retirada de hepatócitos para terapia gênica *ex vivo* e o fácil acesso ao fígado tornam esse órgão um alvo de escolha, não apenas para o tratamento de doenças que afetam diretamente os hepatócitos, como hipercolesterolemia familiar ou hemofilia, mas também para doenças que necessitam de liberação de proteínas na circulação sanguínea (14).

O tecido hematopoiético é o tecido mais acessível para a realização de qualquer tipo de terapia gênica. A principal abordagem utilizada prevê a transferência gênica para células totipotentes, almejando-se a correção definitiva. Avanços no entendimento sobre a biologia das células tronco hematopoéticas têm facilitado esta tarefa. Diferentes protocolos clínicos têm sido utilizados com essa abordagem para o tratamento de doenças monogênicas, infecciosas e câncer.

Com relação ao tecido muscular, a manipulação de mioblastos apresenta características favoráveis por serem células fáceis de cultivar e poderem ser modificadas *ex vivo*. Além disso, o tecido muscular é altamente vascularizado e de fácil acesso para injeção direta

de DNA, sendo utilizado para tratamento de distrofias musculares e doenças vasculares (15).

Desenvolvimento de protocolos

As pesquisas de terapia gênica devem obrigatoriamente passar por estudos pré-clínicos e clínicos (fase I, II, III, IV). Os estudos pré-clínicos são realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os dados *in vivo* são obtidos em animais. Nessa etapa, avalia-se principalmente a eficiência de transferência, toxicidade do produto gênico, biodistribuição do vetor, taxa de integração, níveis de RNA e proteínas produzidos. As avaliações *in vivo* podem ser analisadas através da expressão de genes marcadores sob controle de regiões regulatórias.

Após os testes pré-clínicos, a etapa seguinte prevê os estudos clínicos. Atualmente, mais de 3 mil pacientes estão sendo tratados com terapia gênica experimental. Estudos clínicos de fase I realizam os primeiros testes da nova droga e têm como objetivo avaliar a segurança e parâmetros farmacológicos básicos. Dado os aspectos éticos e de segurança envolvidos, somente pacientes com

doenças graves são incluídos em estudos de terapia gênica de fase I. Nessa fase, não é avaliada a eficácia terapêutica, e sim a viabilidade e segurança, e estabelecida a dose aceitável (4). Em média 6 pacientes são envolvidos. Os estudos clínicos de fase II investigam a eficácia da terapia gênica nos pacientes e servem para acumular dados sobre a segurança. Em média 20 pacientes são recrutados nessa etapa.

Como a terapia gênica é uma área que apresenta muitas questões a serem resolvidas, as fases I e II costumam levar mais tempo do que as fases estabelecidas para avaliação de drogas terapêuticas tradicionais. Por isso, criou-se uma fase intermediária, chamada de fase I/II. Uma vez demonstrado o efeito terapêutico, em um número limitado de pacientes, segue-se para a fase III, onde então é envolvido um grande número de indivíduos. O objetivo é obter informações estatísticas para demonstrar a validade dos efeitos observados nos estudos de fase II, além de servir para comparar os efeitos do novo tratamento com as terapias tradicionais, se elas existirem. Esses estudos envolvem múltiplos centros de pesquisa internacionais. Até o momento, 5

Tabela 3. Estudos de terapia gênica em fase II

Doença	Vetor	Transferência gênica	Gene	Estratégia terapêutica
Câncer	Lipídios catiônicos	Células tumorais <i>in vivo</i>	HLA B7	Reforçar o sistema imunológico
Câncer	Lipídios catiônicos	Células tumorais <i>in vivo</i>	IL-2	Reforçar o sistema imunológico
Câncer	Adenovírus	Células tumorais <i>in vivo</i>	P53	Indução de apoptose
Câncer	Retrovírus	Células tumorais <i>in vivo</i>	Timidina quinase	Destruição através de atividade enzimática /ou pró-droga
Câncer	Retrovírus	Células tumorais <i>ex vivo</i>	IL-12	Reforçar o sistema imunológico
Isquemia	DNA nu	Células musculares <i>in vivo</i>	VEGF	Estimulação da angiogênese
Fibrose Cística	Adenoassociado	Células do trato respiratório <i>in vivo</i>	CFTR	Prover a proteína funcional

protocolos clínicos atingiram a fase III. Nenhum protocolo clínico atingiu a fase IV que prevê um estudo epidemiológico a longo prazo. A tabela 3 mostra alguns exemplos notáveis de terapias que progrediram para a fase II e que estão apresentando dados de atividade biológica encorajadores.

Protocolos para o tratamento do câncer

Até o momento, a terapia gênica para câncer tem mostrado resultados mais promissores do que para as doenças herdadas. As razões para isso são: 1) não é preciso conhecer o gene causador da doença; 2) a expressão pode ser transitória; e 3) limitada ao tecido tumoral. Diferentes tipos de protocolos têm sido propostos, tais como imunoterapia, gene suicida, restauração da função de proteínas indutoras de apoptose, bloqueio da expressão de oncogenes e aumento da resistência a quimioterapia.

A imunoterapia é a estratégia mais utilizada e consiste em transferir genes, cujos produtos irão estimular o sistema imune a reconhecer o tumor. Os principais genes utilizados têm sido os que codificam interleucinas (16). A estratégia do gene suicida, segunda maior abordagem de terapia gênica para o câncer, prevê a inserção do gene da timidina quinase nas células tumorais (17). Esse gene é capaz de converter uma pró-droga não tóxica (ganciclovir), em uma espécie citotóxica, altamente potente (ganciclovir 3-P). A restauração da função de p53 é outra abordagem para o tratamento de câncer. A proteína p53 normal pode induzir apoptose em células transformadas, capacidade perdida, quando ocorrem mutações nesse gene. Observou-se que a introdução do gene p53 normal, mediado por retrovírus, pode suprimir o crescimento de tumor de pulmão humano, cujas linhagens celulares apresentaram p53 deletado ou com expressão anômala (18). Oligonucleotídeos *antisense* estão sendo usados para inibir a expressão de oncogenes e outras proteínas envolvidas na progressão do tumor. Finalmente, é possível introduzir genes, como o MDR-1 (*multiple drug resistense*), em células hematopoiéticas normais, com o objetivo de protegê-las dos efeitos tóxicos da quimioterapia (19). Desta forma, é possível

aumentar a dose e a frequência da quimioterapia para alcançar a cura.

Segundo Steven Rosemberg, a terapia gênica representa uma quarta abordagem terapêutica no tratamento contra o câncer, depois da cirurgia, da radio e da quimioterapia. Para as doenças genéticas herdadas, entretanto, esta nova abordagem pode se constituir na primeira forma de tratamento disponível.

Conclusão e perspectivas

A terapia gênica é uma área fértil para pesquisa científica e há muita esperança de que se torne uma prática clínica importante nesse novo século, representando mudanças de paradigmas na medicina, com importantes repercussões para a sociedade. Sem dúvida, a revolução genômica também tem contribuído para que muitos genes que apresentam relação causal com determinadas doenças sejam futuramente alvo da terapia gênica. Quanto aos progressos nessa área, é importante salientar que o desenvolvimento de uma droga comum, desde o momento de sua concepção até a sua produção, leva pelo menos 10 anos de pesquisas, e que no caso da terapia gênica, apenas agora estamos a uma década de seu início.

Referências

1. Anderson F. The best of times, the worst of times. *Science* 2000;288:627-9.
2. www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical
3. Miller AD. Nonviral delivery systems for gene therapy. In: Lemoine NR, editor. *Understanding gene therapy*. London: Bios Scientific Publishers; 1999. p. 172.
4. Larrick JW, Burck KL. *Gene Therapy*. New York: Elsevier; 1991. p. 281.
5. Murphy SJ. Viral delivery systems for gene therapy. In: Lemoine NR, editor. *Understanding gene therapy*. London: Bios Scientific Publishers; 1999. p. 172.
6. Wang G, Sinn PL, McCray PB Jr. Development of retroviral vectors for gene transfer to airway epithelia. *Curr Opin Mol Ther* 2000;2:497-506.
7. Wang L, Nichols TC, Read MS, Bellinger DA, Verma IM. Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver. *Mol Ther* 2000;1:154-8.

8. Galderisi U, Cascino A, Giordano A. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *J Cell Physiol* 1999;181:251-7.
9. James HA, Gibson I. The therapeutic potential of ribozymes. *Blood* 1998;91:371-82.
10. Welch PJ, Yei S, Barber JR. Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Diagn Virol* 1998;10:163-71.
11. Walters LR, Palmer JC. *The Ethics of Human Gene Therapy*. New York: Oxford University Press; 1997. p. 209.
12. Vassaux G. Gene therapy for monogenic diseases. In: Lemoine NR, editor. *Understanding gene therapy*. London: Bios Scientific Publishers; 1999. p. 172.
13. Baekelandt V, De Strooper B, Nuttin B, Debyser Z. Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Mol Ther* 2000;2:540-54.
14. Grompe M. Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:231-44.
15. Rigg AS. Gene therapy for multifactorial genetic disorders. In: Lemoine NR, editor. *Understanding gene therapy*. London: Bios Scientific Publishers; 1999. p. 172.
16. Bennett JJ, Malhotra S, Wong RJ, Delman K, Zager J, et al. Interleukin 12 secretion enhances antitumor efficacy of oncolytic herpes simplex viral therapy for colorectal cancer. *Ann Surg* 2001;233:819-26.
17. Rivas C, Miller AR, Collado M, Lam EW, Apperly JF, Melo JV. Bcr-abl-expressing cells transduced with the hsv-tk gene die by apoptosis upon treatment with ganciclovir. *Mol Ther* 2001;3:642-52.
18. Swisher SG, Roth JA. Gene therapy in lung cancer. *Curr Oncol Rep* 2001;2:64-70.
19. Licht T, Goldenberg SK, Vieira WD, Gottesman MM, Pastan I. Drug selection of MDR1-transduced hematopoietic cells ex vivo increases transgene expression and chemoresistance in reconstituted bone marrow in mice. *Gene Ther* 2000;7:348-58.

Estratégias de tratamento para os erros inatos do metabolismo

Carolina F. M. Souza¹, Claudia R. Cecchin¹, Gustavo H. B. Maegawa¹,
Denise I. Zandoná¹, Ricardo F. Pires¹

Recentes avanços no diagnóstico e tratamento dos erros inatos do metabolismo têm melhorado substancialmente o prognóstico de muitos pacientes com estas condições. Na prática médica é importante o diagnóstico precoce destas patologias, especialmente em um paciente agudamente enfermo, para que um tratamento adequado e rápido seja instituído. Neste artigo, apresentamos várias estratégias terapêuticas para alguns erros inatos do metabolismo, que devem ser utilizadas no sentido de melhorar o seu prognóstico.

Unitermos: Tratamento; doença genética; erros inatos do metabolismo; enzimas.

Treatment strategies for inborn errors of metabolism

Recent advances in the diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism (IEM) have improved substantially the prognosis for many of these conditions. In the clinical practice it is important to recognize this pathology mainly in an acute situation, when the early intervention is essential. In this article, we presented some therapeutic strategies for IEM that should be used to improve their prognosis.

Key-words: Treatment; genetic diseases; inborn errors of metabolism; enzymes.

Revista HCPA 2001(3):387-396

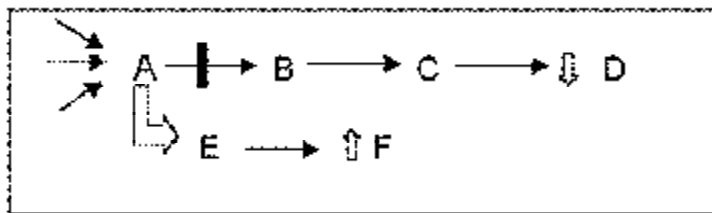
Introdução

O progresso nos últimos anos tem proporcionado um melhor entendimento das bases bioquímicas e moleculares dos erros inatos do metabolismo (EIM) e, com isso, resultado em um melhor arsenal terapêutico para tratar muitas dessas desordens. Mesmo sabendo que para algumas doenças o tratamento ainda é escasso, visto que o gene responsável e o seu produto ainda são desconhecidos, os avanços nos diagnósticos desses distúrbios e a melhor definição do erro metabólico envolvido permite

aos afetados que se ofereça alternativas terapêuticas mais eficazes (1). É importante lembrar que o dano neurológico em algumas situações está diretamente relacionado com o tempo e o período de exposição ao metabólito tóxico. Portanto, a intervenção e o diagnóstico precoces são fundamentais na definição do prognóstico do afetado.

A principal estratégia terapêutica nessas condições é a correção do desequilíbrio metabólico, sendo utilizadas diversas estratégias para tentar evitar as conseqüências funestas do defeito genético em uma rota metabólica

¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Correspondência: Dra. Carolina F. M. Souza, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil. Fax: +55-51-3316 8010; e-mail: zecarol@terra.com.br



Normalmente o substrato A é convertido em metabólitos intermediários e finalmente ao produto D. Por um erro inato do metabolismo, a enzima que converte A em B está deficiente provocando acúmulo do A (precursor tóxico), levando a uma rota metabólica alternativa F e redução da formação do produto D.

Figura 1. Estratégias empregadas no tratamento de doenças genéticas

específica (figura 1). Descrevemos a seguir alguns princípios gerais empregados no tratamento do EIM, medidas emergenciais na criança agudamente enferma e o manejo específico de algumas doenças metabólicas.

Princípios gerais no tratamento dos EIM

Ressaltamos aqui a diferença do acúmulo de pequenas moléculas do metabolismo intermediário que provocam um quadro clínico agudo tipo “intoxicação”. Em contraste, o acúmulo de moléculas complexas, como por exemplo esfingolipídios e mucopolissacarídeos, usualmente levam a sintomas crônicos, progressivos independentes de manifestações agudas.

Restrição dietética do substrato

A restrição dietética é uma das principais formas de tratamento para muitas doenças metabólicas, como a fenilcetonúria (PKU), onde há o acúmulo de fenilalanina, a doença do xarope do bordo (MSUD), que apresenta acúmulo de leucina, isoleucina e valina, e a homocistinúria, com acúmulo de homocisteína e metionina. Nestes casos, a deficiência enzimática leva ao excesso de substrato, causando intoxicação aguda ou crônica, com o conseqüente dano neurológico progressivo.

Ingesta de substratos que competem com o substrato tóxico

O principal objetivo é utilizar substratos alimentares ou medicamentosos que exerçam uma competição com o substrato metabólico tóxico que está sendo acumulado no organismo. O principal exemplo, apesar de haver controvérsias quanto à sua eficácia, é o uso do

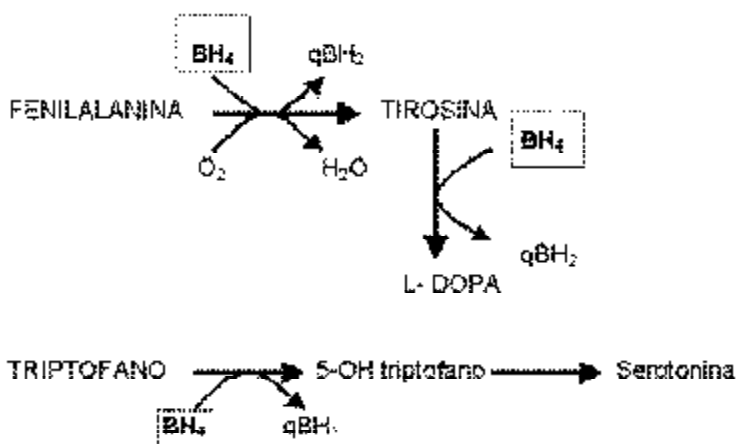
óleo de Lorenzo (glicerol trioleato e glicerol trierúcido) para o tratamento da adrenoleucodistrofia ligada ao X. Aplica-se também o uso de zinco na doença de Wilson e resinas nas hiperlipidemias (1).

Remoção do metabólito tóxico

Nas desordens do ciclo da uréia, uma medida importante é a remoção do metabólito tóxico (amônia) através da utilização de outro substrato (medicamento) que provoca um desvio da rota metabólica. O uso do benzoato de sódio, fenilacetato ou fenilbutirato de sódio leva a um aumento da excreção dos compostos nitrogenados, reduzindo desta forma o acúmulo da amônia. Alguns co-fatores, como por exemplo, a L-carnitina, tem demonstrado seu importante papel no tratamento de algumas acidemias orgânicas e nas doenças que afetam o seu transporte, pois auxilia na remoção celular de alguns metabólitos tóxicos (2,3). Além disso, a hemofiltração venosa contínua, a hemodiálise e a diálise peritoneal podem ser usados como métodos eficazes de remoção forçada do substrato. Embora a diálise peritoneal possa ser considerada um procedimento mais simples, o tempo de remoção de aminoácidos, ácidos orgânicos ou amônia é mais lento.

Reposição do produto deficiente

Em alguns EIM, a manifestação clínica está diretamente relacionada à falta do produto. A reposição deste é exemplificada nas doenças do ciclo da uréia, onde a reposição de arginina ou citrulina pode reverter o quadro de intoxicação por amônia; nas glicogenoses, onde o uso do carboidrato reverte a hipoglicemia, e na deficiência de tetrahydrobiopterina (BH4), onde o uso dos neurotransmissores L-Dopa e 5-OH-



Importância da tetrahydrobiopterina (BH_4) na biossíntese dos neurotransmissores dopamina e serotonina.

Figura 2. Hidroxilação da fenilalanina em tirosina, tirosina em DOPA, e triptofano em 5-hidroxitriptofano.

triptofano melhoram o desenvolvimento neuropsicomotor e reduzem consideravelmente as crises convulsivas e conseqüente deterioração neurológica (4)(figura 2).

Bloqueio na formação do metabólito tóxico

Nos casos de tirosinemia hepatorenal, além do tratamento dietético com restrição da ingestão de tirosina e fenilalanina, a introdução do NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) foi um marco para o avanço do tratamento. Esta droga reduz o acúmulo de fumarilacetoacetato e maleilacetoacetato por inibição da enzima 4-hidroxifenilpiruvato desidrogenase, diminuindo complicações hepáticas, como cirrose e o hepatocarcinoma de manifestação precoce. Na doença de Wilson, caracterizada por manifestações hepáticas e neurológicas associadas à severa hemólise intravascular decorrente de um acúmulo de cobre no fígado e outros órgãos, utiliza-se a penicilamina, que impede o depósito de cobre e aumenta a sua excreção urinária (5).

Estímulo da atividade enzimática residual

As propriedades catalíticas de algumas enzimas dependem da participação de grupos não protéicos, como as vitaminas ou minerais, que agem como cofatores obrigatórios ou coenzimas de muitas rotas metabólicas (tabela 1). Nos pacientes com deficiência de biotinidase,

o tratamento com uso da biotina - cofator fundamental na atividade de quatro carboxilases (acetil-CoA carboxilase, propionil-CoA carboxilase, piruvato carboxilase e 3-metilcrotonil-CoA carboxilase) - leva à uma resposta clínica dramática, revertendo o quadro de convulsões, acidose metabólica e manifestações cutâneas (5). Um outro exemplo é o uso da vitamina B12 nos pacientes com acidemia metilmalônica por deficiência da enzima mitocondrial dependente de cobalamina (metilmalonil-CoA mutase), que resulta em uma importante resposta terapêutica com reversão das manifestações clínicas da acidemia orgânica. Sabe-se também que aproximadamente 50% dos casos de homocistinúria por deficiência da cistationina b-sintase respondem ao uso de grandes quantidades de piridoxina (vitamina B6), aumentando a atividade enzimática, diminuindo o acúmulo de homocisteína sérica, reduzindo eventos isquêmicos e oftalmológicos relacionados à síndrome da homocistinúria (6). O uso das vitaminas (coenzimas) a longo prazo deve ser restrito a pacientes com erros metabólicos sabidamente responsivos a tal tratamento. Enfatiza-se ainda o uso de várias vitaminas associadas para pacientes agudamente enfermos sem o diagnóstico estabelecido (tabela 2). Esta medida está indicada para os casos em que o tempo de investigação diagnóstica será demorado, podendo levar a uma piora do paciente (1).

Tabela 1. Exemplos de EIM responsivos ao uso de cofatores

Doença	Defeito	Cofator	Dose
Acidúria Glutárica tipo I	Glutaril – CoA desidrogenase	Riboflavina ^a	20-40 mg/dia
Acidúria metilmalônica	Metilmalonil CoA mutase	Cobalamina (B12)	1 mg IM/ dia
Acidúria propiônica	Propionil CoA carboxilase	Biotina ^a	5-10 mg/dia
Convulsões dependentes de piridoxina	Rota metabólica do GABA	Piridoxina (B6)	50-100 mg/dia
Doença do Xarope do Bordo	Carboxilases de cadeia ramificada	Tiamina	10-50 mg/dia
Doença do ciclo da uréia	Várias envolvidas no ciclo da uréia	Piridoxina	50-100 mg/dia
Doença da cadeia respiratória	Enzimas mitocondriais	Ubiquinona ^a	100-300 mg/dia
Homocistinúria	Cistationina β- sintase	Piridoxina (B6)	50-100 mg/dia

^a resposta terapêutica reduzida

Reposição enzimática

Alguns EIM se caracterizam pelo acúmulo de substâncias que não são afetadas ou modificadas pela manipulação dietética ou pela intervenção farmacológica tradicional. Este grupo compreende as doenças lisossômicas de depósito (DLD), cuja deficiência enzimática leva ao acúmulo intra-lisossomal de moléculas hidrofóbicas (moléculas complexas) que praticamente não sofrem influência da manipulação ambiental (5).

As principais DLD são as mucopolissacaridoses (MPS I, II, III, IV, VI e VII), as oligossacaridoses (fucosidose, mannosidose, sialidose, aspartilglicosaminúria e a doença de Schindler), as mucopolipidoses (II, III e IV) e as esfingolipidoses (doença de Gaucher, doença de Niemann-Pick A e B, doença de Fabry, doença de Farber, gangliosidoses GM1 e GM2, galactosialidose, doença de Krabbe e leucodistrofia metacromática).

A abordagem terapêutica para algumas destas situações é baseada na reposição da enzima não funcionante. Em teoria, preconiza-se a aplicação endovenosa de uma proteína com função enzimática endereçada à célula alvo que deve ser incorporada ao lisossomo, das moléculas complexas acumuladas.

Formas modificadas de enzimas a partir

da tecnologia de recombinação genética apareceram comercialmente no cenário terapêutico a partir do início da década de 90 com o tratamento de reposição enzimática (TRE) para a doença de Gaucher. Atualmente encontram-se em desenvolvimento e estudo o TRE para algumas MPS, para doença de Fabry e para a doença de Niemann-Pick.

O tratamento para doença de Gaucher é baseado no TRE com uma forma recombinante modificada da enzima β-glicosidase (Imiglucerase[®]). A dose preconizada pelo fabricante é de 60 U/Kg de peso corporal a cada 15 dias. A monitorização inclui acompanhamento das medidas do volume do baço e do fígado, níveis de hemoglobina e plaquetas, além do controle de alterações ósseas. A TRE é eficaz e segura, revertendo o quadro clínico da doença (7). Desde 1994, o Serviço de Genética Médica opera em conjunto com a Unidade de Quimioterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre um programa de TRE para doença de Gaucher. No programa, encontramos à disposição dos pacientes a confirmação diagnóstica pelo ensaio enzimático, a análise molecular das principais mutações, dosagem de quitotriosidase no plasma, atendimento multidisciplinar além da TRE e aconselhamento genético para a família.

Tabela 2. Coquetel vitamínico recomendado

Vitamina	Dose	Via
Biotina	10 mg/dia	Oral ou IV
Tiamina	200 mg/dia	Oral
Ácido lipóico	100 mg/dia	Oral
L-carnitina	25 mg/kg a cada 6 hs	Oral ou IV
Coenzima Q10	5 mg/kg/dia	Oral
Vitamina B12	1 mg/dia	IM
Vitamina C	100 mg/kg/dia	Oral
Riboflavina	100-300 mg/dia	Oral

Fernandes J, Saudubray J-M, Van den Berghe.

Uma forma recombinante da enzima α -L-iduronidase já foi usada no tratamento da MPS I. A TRE com α -L-iduronidase foi capaz de regredir a hepatoesplenomegalia, elevar o peso e a estatura, além de aumentar a mobilidade articular dos pacientes estudados (8).

Atualmente, encontra-se em desenvolvimento uma forma recombinante da enzima α -galactosidase A, destinada ao tratamento da doença de Fabry. A TRE com α -galactosidase A foi capaz de degradar o depósito de GL3 dos rins, coração e pele dos pacientes, demonstrando ter potencial para a reversão do quadro clínico (9).

Transplante de órgãos

Os transplantes de medula óssea (TMO), através da transferência de células hematopoiéticas, possibilitam, em alguns casos, o restabelecimento da função enzimática previamente deficiente. São utilizados para as DLDs e adrenoleucodistrofia ligada ao X, porém há poucos casos relatados em que houve sucesso neste procedimento, visto ser bastante agressivo e não reverter o dano neurológico previamente estabelecido. Além disso, as indicações do procedimento são extremamente limitadas e consideram o tipo de patologia, sua evolução e a idade do paciente (1).

O transplante de fígado tem sido realizado com sucesso para inúmeros EIM. No entanto, com exceção da síndrome de Crigler – Najjar, glicogenose tipo VI e falência hepática aguda pela doença de Wilson, as indicações deste procedimento para outros EIM como acidúrias

orgânicas, defeitos do ciclo da uréia, tirosinemia hepatorenal sem envolvimento renal, ainda é bastante controversa e discutida nos grandes centros (5).

Tratamento sintomático

Apesar dos muitos avanços atingidos no tratamento dos EIM, a maioria deles ainda não possui uma terapêutica eficaz capaz de reverter o quadro evolutivo. Nestes casos, devemos considerar a importância do manejo sintomático com objetivo de melhorar a qualidade de vida do paciente e de sua família. Uma criança ou adulto com EIM deve ser acompanhado por uma equipe multidisciplinar que irá tratar de suas complicações, relacionadas ou não ao dano metabólico. Exemplificando, em pacientes com EIM com crises convulsivas é necessário o uso de anticonvulsivante adequado para cada caso. Nas doenças mitocondriais devemos evitar o uso de valproato e barbitúricos, pois estes podem inibir ainda mais a atividade da cadeia respiratória. Em algumas doenças lisossômicas de depósito, em especial as mucopolissacaridoses, é fundamental a investigação e prevenção da apnéia do sono, síndrome do túnel do carpo, instabilidades da coluna cervical, hidrocefalia, hipoacusia, riscos anestésicos, entre outros. Para cada complicação associada à doença base, há um manejo específico, lembrando sempre que os cuidados básicos de saúde como a nutrição, vacinação, higiene, cuidados dentários devem ser os mesmos de uma criança/adolescente e adulto sem um EIM (10).

Manejo em encefalopatias metabólicas agudas

Quando devemos suspeitar de um EIM?

Os sinais e sintomas apresentados por uma criança com EIM são geralmente inespecíficos, mas alguns indícios podem nos conduzir a uma suspeita mais forte, como: a) história de morte neonatal ou infantil sem causa definida, b) consangüinidade entre os pais, c) encefalopatia inexplicável que ocorre em qualquer idade e de uma forma recorrente, d) episódios de hipoglicemia em jejum, acidose metabólica associada ou não à gastroenterite, e) regressão neurológica, f) hepato e/ou esplenomegalia e icterícia colestatia, g) déficit de crescimento e/ou alterações osteoarticulares.

Manejo geral

As principais doenças metabólicas do período neonatal são as acidemias orgânicas, defeitos do ciclo da uréia, doença do xarope do bordo, defeitos da oxidação dos ácidos graxos e a acidose láctica congênita.

Frente à suspeita clínica de uma criança agudamente enferma com doença metabólica, e na presença de dificuldades alimentares, letargia, vômitos, alterações no tônus, cianose, convulsões, irritabilidade, acidose metabólica, hipoglicemia, alcalose respiratória e coma (13) devemos adotar as seguintes condutas: (a) suporte intensivo, (b) restrição nutricional, (c) remoção de toxinas, (d) monitoramento bioquímico, (e) terapias adicionais.

Suporte intensivo

A maioria dos pacientes com encefalopatia apresenta-se gravemente doente, necessitando muitas vezes de um suporte ventilatório e circulatório. Durante a crise metabólica, os pacientes podem se apresentar com dificuldade de alimentação, aumento da diurese e insuficiência renal (pré-renal). Deste modo, a reposição volêmica e correção hidroeletrólítica faz-se necessária. A cetoacidose, devido ao acúmulo de ácidos orgânicos, provoca a desidratação intracelular, normalmente subestimada. Neste caso, uma re-hidratação impestiva com soluções e alcalinizações pode levar rapidamente à piora do paciente. Quando grave ($\text{pH} < 7,10$, $\text{HCO}_3^- < 10 \text{ mEq/L}$), a acidose deve ser corrigida lentamente com uso

do bicarbonato, uma vez que a correção agressiva pode provocar edema cerebral, hipernatremia e até hemorragia cerebral. Alguns pacientes com desordens do ciclo da uréia apresentam-se com uma acidemia moderada, que não deve ser corrigida, pois a acidose protege da dissociação da amônia e sua inerente toxicidade. A descompensação metabólica, algumas vezes, está associada a um quadro séptico, para o qual devem ser adotadas medidas como exames culturais, antibióticos etc.

Restrição nutricional

A supressão da produção do metabólico tóxico oriundo do catabolismo endógeno protéico é essencial no tratamento da encefalopatia metabólica. Quando o estado clínico do paciente permite uma nutrição enteral contínua, esta deve ser adotada. A composição da fórmula enteral deve ser glicolípida. É importante ressaltar que uma dieta totalmente aprotéica não deve se estender por mais de 48 horas. Após o controle dos níveis aumentados dos metabólitos tóxicos, proteínas naturais devem ser reintroduzidas gradativamente em quantidades adequadas conforme as necessidades calóricas do paciente. Em certos casos, a intolerância digestiva ou aplicação de uma técnica de remoção de toxinas impedem a administração de dieta enteral. Uma nutrição parenteral hipercalórica deve então ser introduzida durante o tratamento de emergência.

Remoção de toxinas

A ex-sanguíneo transfusão (ES) é, em teoria, inadequada na remoção de metabólitos distribuídos nos líquidos biológicos (14); no entanto, ES feita em grandes volumes é um método efetivo em vários EIM, como a doença do xarope do bordo, a acidemia metilmalônica, a acidemia isovalérica e os distúrbios do ciclo da uréia. O efeito é, entretanto, transitório, o que limita seu uso (15). Portanto, deve ser usada em associação com outros métodos, como a diálise peritoneal (DP), um tratamento de caráter emergencial eficaz em recém-nascidos com vários distúrbios metabólicos e facilmente executável em uma unidade de terapia intensiva pediátrica. Com frequência, seu uso prolongado não é necessário, exceto

nos distúrbios do ciclo da uréia. Em termos de depuração, a DP é bem menos eficaz que a hemodiálise e a hemofiltração, porém tem a vantagem de ser mais simples. Hemodiálise é o método mais eficaz e rápido na remoção de pequenos solutos. Entretanto, sua execução é tecnicamente sofisticada e requer uma equipe especializada (12).

Monitoramento bioquímico

Consiste na dosagem seriada de parâmetros bioquímicos no sangue, urina e dialisados ou ultra-filtrados. Deve-se também monitorar eletrólitos que, uma vez alterados, devem ser prontamente corrigidos. Hemograma e plaquetas devem ser constantemente realizados já que algumas acidemias orgânicas podem ser acompanhadas de neutropenia, trombocitopenia que necessitam de transfusões específicas.

Outras formas de tratamento

A insulino-terapia têm sido usada para suprimir o catabolismo severo e induzir o anabolismo. Fatores de descompensação como desidratação e acidose devem ser corrigidos concomitantemente. Infusões em grandes quantidades (0,2 – 0,3 IU/kg/h) de líquidos em associação à infusão de altas taxas de glicose via parenteral é extremamente útil nestes casos. O monitoramento da glicemia também deve ser freqüente. Pode-se suspender a infusão contínua de insulina com a normalização dos níveis de glicose.

Dependendo do erro inato do metabolismo envolvido, terapias específicas podem ser utilizadas. Como na maioria das situações de encefalopatia metabólica não se conhece a etiologia, utiliza-se inicialmente os cofatores vitamínicos já descritos na tabela 2.

Sabendo que alguns EIM o diagnóstico é possível somente nos períodos de descompensação metabólica, é imprescindível a coleta de urina e sangue antes do início do tratamento, pois isto poderá facilitar a investigação diagnóstica do paciente.

Tratamento em algumas patologias

Acidemias orgânicas

O termo acidemias ou acidúrias orgânicas se aplica a um grupo de distúrbios

caracterizados pela excreção de ácidos orgânicos na urina e causados por deficiência enzimática. Várias acidemias orgânicas resultam de uma desordem no catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada. Elas englobam a doença do xarope do bordo, a acidemia propiônica, a acidemia isovalérica, a acidemia metilmalônica, a glutárica, deficiência da 3-metilcrotonil-CoA carboxilase não-responsiva à biotina, a deficiência da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) liase, entre outras.

Os sintomas clínicos são na maioria das vezes inespecíficos e geralmente levam a um quadro de encefalopatia.

A primeira linha no diagnóstico nas acidemias orgânicas consiste fundamentalmente na análise de ácidos orgânicos na urina através da cromatografia gasosa associada à espectrofotometria de massa (CG/MS). Dependendo da desordem específica, a medida da concentração de aminoácidos no plasma pode auxiliar no diagnóstico.

A conduta inicial em um paciente com suspeita de acidemia orgânica consiste em:

• **Frente à crise de descompensação sem diagnóstico** - 1. ventilação assistida; 2. correção do distúrbio hidro-eletrolítico; 3. retirada da proteína da dieta; 4. coleta de amostras [plasma: 1-2 ml após centrifugação imediata do sangue colhido com heparina. Congelar à -20°C; sangue: 4-6 gotas em papel filtro (Guthrie, Whatmenn 3 MM ou similar); urina: 10-20 ml, congelar imediatamente a -20°C; DNA: 3-10 ml de sangue total em EDTA; líquido: 1 ml e congelar imediatamente -70°C]; 5. administração parenteral de soro fisiológico com glicose; 6. administração parenteral grande quantidade de calorias (glicose 30g/kg/dia, insulina 0,05-0,2 U/kg/h, lipídios 2-4 g/kg/dia, se defeito de oxidação por ácidos graxos for afastado); 7. hemodiálise, diálise peritoneal ou ex-sanguíneo transfusão; 8. uso do coquetel vitamínico parenteral (já mencionado no texto); 9. L-carnitina 100 mg/kg/dia (três doses); 10. L-arginina 2 mmol/kg nas primeiras duas horas e após a 2 mmol/kg/dia

• **Frente à crise de descompensação com diagnóstico definido** - 1. manutenção das medidas de suporte; 2. administração parenteral de grande quantidade de calorias na

Tabela 3. Dieta protéica (proteínas total) e calorias recomendadas para os distúrbios do ciclo da uréia

Idade (anos)	Proteína total(g/kg/dia)	Calorias (kcal/kg/dia)
0 – 1	1,2 – 2,2	120 – 145
1 – 7	1,0 – 1,2	100 – 120
7 – 19	0,7 - 1,4	80 – 110
>19	0,5 – 1,0	35 – 65

forma de carboidratos e lipídios; 3. administração parenteral de soro fisiológico e glicosado; 4. reintrodução parenteral ou por sonda nasogástrica de proteínas (0,5-0,7 g/kg/dia); 5. L-carnitina 100 mg/kg/dia; 6. uso e vitaminas específicas.

• **Tratamento a longo prazo** - 1. restrição proteica com formulas especiais; 2. suplementação de aminoácidos não pertencentes à rota metabólica, vitaminas, sais minerais e carnitina.

• **Caso o diagnóstico não seja esclarecido, recomenda-se** - 1. pele: colher 2 fragmentos (0,5 cm) com técnica cirúrgica e colocar em meio de cultura asséptica; 2. músculo esquelético: obter 200 mg (estudos de DNA, histoquímica, imunocitoquímica e enzimas mitocondriais). Congelar imediatamente a -70° C; 3. rim: colher 100 mg (estudos histoquímicos e enzimáticos). Congelar imediatamente a -70° C.

Distúrbios do ciclo da uréia

O ciclo da uréia é um conjunto de seis reações metabólicas que tem por objetivo eliminar o excesso de amônia que se forma da degradação dos aminoácidos e outros compostos nitrogenados. Consideramos hiperamonemia o valor de amônia plasmática maior que 150 mmol/L durante o período neonatal e maior que 80 mmol/L, posteriormente.

A hiperamonemia se constitui em uma urgência metabólica, sendo que o diagnóstico da patologia deve ser realizado o mais precoce possível. Os pacientes com distúrbios do ciclo da uréia apresentam dificuldades alimentares, vômitos, letargia, irritabilidade, taquipnéia, crises convulsivas, alterações no comportamento, podendo evoluir para

encefalopatia aguda com coma. O coma hiperamonêmico ocorre quando a dosagem sérica de amônia é maior que 300umol/L. Sendo uma emergência médica, deve-se instaurar tratamento imediato com a finalidade de prevenir dano cerebral irreversível.

Tratamento das manifestações agudas das doenças do ciclo da uréia

Estabelecer uma via aérea para ventilação mecânica. A hiperamonemia geralmente está associada à alcalose respiratória.

• **Acesso venoso** - administrar líquidos suficientes para manter o equilíbrio hemodinâmico adequado, monitorizando a possibilidade de edema cerebral. O aporte calórico necessário deve ser em forma de solução glicosada (10 – 15%) para limitar o catabolismo endógeno;

• **Diminuir a absorção intestinal de amônia** - a utilização de lactulose por via oral ou na forma de enema, junto com antibióticos (neomicina) reduz a absorção de amônia na luz intestinal;

• **Administração de L-arginina e carnitina** - se possível, por via intravenosa e na dose de 250-500 mg/kg/dia e 22 mg/kg/dia, respectivamente, mesmo sem o conhecimento do defeito enzimático;

• **Administração de benzoato sódico e fenilbutirato sódico** - podem ser administrados na dose de 250-500mg/kg/dia e 250/mg/kg/dia, respectivamente;

• **Utilização de métodos de diálise** - quando as medidas anteriores não forem satisfatórias, utilizam-se os métodos de diálise (hemofiltração, hemodiálise, diálise peritoneal);

• **Reintrodução das proteínas** - após a redução das concentrações da amônia plasmática (inferior a 100umol/L) podemos reintroduzir as proteínas (0,5g/Kg/dia) e avaliar

sua aceitação, monitorizando os níveis plasmáticos de amônia.

Tratamento a longo prazo

- Aporte protéico tolerado varia para cada paciente. Deve-se evitar elevações da amônia plasmática acima de 50 μ mol/L. Em resumo, deve-se prevenir o catabolismo protéico excessivo e introduzir um aporte calórico adequado. No entanto, deve-se administrar quantidade suficiente de proteína para permitir o crescimento adequado (tabela 3);
- todos os pacientes com déficit enzimático do ciclo da uréia, exceto aqueles que têm déficit de arginase, necessitam um suplemento de arginina para manter os níveis plasmáticos do aminoácido essencial entre 50 e 150 μ mol/L;
- vias alternativas para a excreção de nitrogênio: O objetivo consiste na excreção de nitrogênio em uma via diferente do ciclo da uréia. Os fármacos utilizados são o benzoato de sódio e o fenilbutirato de sódio. O benzoato de sódio se conjuga com a glicina formando hipurato e excretando 1 mol de nitrogênio para cada mol de benzoato administrado. A dose usual é de 200-300mg/kg/dia, podendo se administrar em situações agudas até 500-700mg/kg/dia. Os principais efeitos secundários são náuseas, vômitos e irritabilidade. O fenilbutirato se combina com a glutamina formando fenilacetilglutamina, eliminando 2 mol de nitrogênio para cada mol de fenilbutirato. A dose usual é de 200-600mg/kg/dia. Os principais efeitos secundários são hipopotassemia e alcalose metabólica. O prognóstico irá depender da idade do paciente no início do tratamento e da resposta terapêutica.

Conclusão

O progresso no tratamento dos EIM tem sido mais lento do que os avanços no conhecimento das bases bioquímicas e moleculares. Nessas patologias, vários passos já foram dados no sentido de atuar sobre a intoxicação aguda ou crônica de metabólitos, seja através de remoção agressiva (diálise) ou manipulação de fórmulas especiais com restrições dietéticas.

A intervenção precoce é crucial no sentido de evitar seqüelas neurológicas, sendo importante também um laboratório de referência, pois há a necessidade periódica de dosagens de alguns marcadores bioquímicos nos casos suspeitos.

Além disso, o tratamento multidisciplinar envolvendo o médico geneticista, pediatra, intensivista, neuropediatra, nutricionista entre outros, contribui para um melhor manejo do paciente suprimindo todas as suas necessidades e melhorando sua qualidade de vida a longo prazo.

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre possui todas as condições necessárias para o atendimento de pacientes portadores de doenças genéticas metabólicas, sendo um centro de referência para o Brasil e a América Latina.

Referências

1. Walter JH, Wraith JE. Treatment: Present Status and New Trends. In: Fernandes J, Saudubray JM Van den Berghe G, editors. Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment. 3th ed. Springer; 2000. p. 75-84.
2. Burton BK. Inborn Errors of Metabolism in Infancy: a Guide to Diagnosis. Pediatrics 1998; 102(6):E69.
3. Leonard JV, Morris AAM. Inborn of metabolism around time of birth. Lancet 2000;356:583-7.
4. Zschocke J, Hoffmann GF. Vademecum Metabolicum. Manual of Metabolic Paediatrics. 2nd ed. Schattauer: Ed German Milupa; 1999.
5. Clarke JTR. A clinical guide to inherited metabolic diseases. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
6. Souza CFM, Giugliani R. Tratamento dos erros inatos do metabolismo. In: Carakushansky G, editor. Doenças genéticas em pediatria. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 211-4.
7. Barton NW, Brady RO, Dambrosie JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency: macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. New Engl J Med 1991;324:1464-70.
8. Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont J, Passage M, et al. Enzyme-replacement

- therapy in mucopolysaccharidosis I. *New Engl J Med* 2001;344:182-8.
9. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, et al. Safety and efficacy of recombinant human (alpha)-galactosidase A replacement therapy in Fabry disease. *N Engl J Med* 2001;345:9-16.
 10. Schwartz IV, Matte U, Leistner S, Giugliani R. Mucopolissacaridoses. In: Carakushansky G, editor. *Doenças genéticas em pediatria*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 180-5.
 11. Pintos G, Briones MP, Marchante C, Sanjurjo P, Vilaseca MA. Protocolo para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los transtornos del ciclo de la urea. I Congreso Nacional Errores Congênicos del Metabolismo de LA A.E.P. Saragoza 31 Mayo al 1º Junio, 1996.
 12. Baulny HO, Saudubray JM. Emergency treatments. In: Fernandes J, Saudubray JM Van den Berghe G, editors. *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment*. 3th ed.. Springer; 2000. p. 75-84.
 13. Donn SM, Swartz RD, Thoene JG. Comparison of exchange transfusion, peritoneal dialysis, and hemodialysis for th treatment of hyperammonemia in an anuric newborn infant. *J Pediatr* 1979;95:67-70.
 14. Saudubray JM, Ogier H, Charpentier C, et al. Hudson memorial lecture. Neonatal management of organic acidurias. *Clinical update. J Inherit Metab Dis* 1984;7(Suppl 1):2-9.
 15. Seashore MR. The organic acidemias: An overview. <http://www.geneclinics>. 2001.

REVISTA HCPA¹

¹A versão completa deste documento é publicada anualmente no primeiro número da Revista HCPA. Além disto, as normas para publicação estão disponíveis na Internet, em www.hcpa.ufrgs.br/revista/index, ou no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

www.hcpa.ufrgs.br/revista/index

Publicação quadrimestral do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, desde 1981.

Normas para publicação

Tipos de Colaboração

Editoriais. Esta seção inclui o editorial de apresentação da Revista, assinado pelo Editor, além de editoriais especiais, que compreendem colaborações solicitadas sobre temas atuais ou artigos publicados na Revista.

Artigos originais. São contribuições novas ao campo de conhecimento, apresentadas de forma a possibilitar a avaliação crítica e global e a replicação por outros investigadores. Os artigos originais podem descrever trabalhos observacionais ou experimentais, prospectivos ou retrospectivos, descritivos ou analíticos. Os artigos submetidos nesta categoria não devem exceder 20 laudas.

Comunicações. Descrevem trabalhos observacionais ou experimentais em andamento, ou seja, os dados apresentados não são conclusivos. As comunicações não devem exceder 15 laudas.

Artigos especiais. Esses artigos

serão solicitados pelo Conselho Editorial e versarão sobre temas atuais ou de interesse permanente, abrangendo políticas de saúde, ensino, pesquisa, extensão universitária e exercício profissional. Também serão considerados nesta categoria artigos clínicos que expressem experiência de grupos ou opinião pessoal de relevância e profundidade, além de artigos de atualização sobre as mais variadas áreas abrangidas pela linha de divulgação científica e tecnológica da *Revista*. Os artigos especiais não devem ter mais de 25 laudas.

Relatos de casos. Os relatos de casos devem descrever achados novos ou pouco usuais, ou oferecer novas percepções sobre um problema estabelecido. O conteúdo deve se limitar a fatos pertinentes aos casos. Relatos de um caso único não devem exceder três laudas, conter até duas ilustrações e ter menos de 15 referências bem selecionadas, já que o objetivo dos relatos não é apresentar uma revisão bibliográfica.

Sessões Anátomo-Clínicas. Esta seção publicará uma seleção de assuntos relevantes de sessões anátomo-clínicas previamente apresentadas no HCPA.

Cartas ao Editor. Correspondência dirigida ao Editor sobre artigos previamente publicados ou sobre temas de interesse relacionados à linha editorial da *Revista*. Não devem exceder duas laudas.

Submissão de trabalhos

A Revista HCPA adota o estilo Vancouver para publicação de artigos. Os artigos submetidos devem ser formatados nesse estilo (conforme *Can Med Assoc J* 1997;156(2):270-7). As instruções relativas ao estilo Vancouver também estão disponíveis no Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os autores deverão submeter quatro cópias da colaboração, juntamente com uma carta de apresentação do artigo dirigida ao Editor e uma

cópia preenchida da Lista de Itens para Conferência da Revista HCPA, que pode ser encontrada ao final das Instruções para os Autores. Só serão considerados para publicação artigos experimentais que documentarem a aprovação pelo Comitê de Ética da instituição na qual o estudo foi desenvolvido. Os artigos deverão ser submetidos em laudas de tamanho A4 (21 x 29,7 cm), com margens de no mínimo 2,5 cm. O texto deverá ser datilografado em espaço duplo, na fonte Arial 11. Todas as páginas devem ser numeradas, começando pela página de rosto.

A Revista aceitará para avaliação artigos em português, inglês ou espanhol. Disquetes serão solicitados em caso de aceitação dos artigos. Colaborações deverão ser enviadas para o seguinte endereço:

Revista HCPA

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Largo Eduardo Zaccaro Faraco

CEP 90035-003

Porto Alegre, RS, Brasil

Todos os artigos serão avaliados por pelo menos dois revisores. Quando os revisores sugerirem modificações, os artigos

serão reavaliados pelo Conselho Editorial depois da inclusão das modificações sugeridas.

Página de rosto

As colaborações submetidas à *Revista HCPA* devem incluir uma página de rosto contendo as seguintes informações:

- Título da colaboração, em português e inglês;
- Nome completo dos autores, seguidos de credenciais e instituição a qual pertencem;
- Até cinco unitermos com tradução para o inglês. Sempre que possível, os autores devem utilizar como termos os tópicos listados pelo Index Medicus (*MeSH - Medical Subject Headings*).
- Endereço completo, telefone e correio eletrônico (se disponível) do autor responsável pela correspondência.

Resumo

Os artigos originais e as comunicações devem conter, obrigatoriamente, um resumo estruturado, com tradução para o inglês. Portanto, o resumo deve explicitar os objetivos, métodos, resultados e conclusões e deve dar ao leitor uma descrição exata do conteúdo do artigo. Os artigos de revisão e outras colaborações deverão apresentar resumos descritivos de até 200 palavras, com tradução para o inglês.

Corpo do artigo

Os artigos originais e comunicações devem seguir o formato "IMRAD", ou seja, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão (e, opcionalmente, Conclusões).

Referências

As referências devem ser listadas de acordo com a ordem de citação no texto. Dentro do texto, as citações deverão ser indicadas entre parênteses: "Vários autores (1, 4, 7) observaram...". As referências que aparecem pela primeira vez em tabelas e figuras devem ser numeradas na seqüência das referências citadas na parte do texto onde a tabela ou a figura aparece pela primeira vez.

Tabelas

As tabelas devem ser numeradas consecutivamente com números arábicos (Tabela 1, Tabela 2, etc.). Todas as tabelas e quadros devem ser referidos no texto. Abreviaturas devem ser explicadas em notas, no final das tabelas. As notas devem ser indicadas com letras sobrescritas.

Figuras e gráficos

Devem ser apresentados em desenho a nanquim, impressão a laser de computador, ou em fotografias que permitam boa reprodução gráfica. As figuras e gráficos devem ser referidos no texto

e numerados consecutivamente com números arábicos (Figura 1, Figura 2, etc.).

Abreviaturas

O uso de abreviaturas deve ser mínimo; porém, sempre que utilizadas, as abreviaturas devem ser introduzidas imediatamente depois do termo a ser abreviado quando este aparecer pela primeira vez no texto. Em tabelas e figuras, todas as abreviaturas devem ser definidas na legenda. O título e o resumo não devem conter abreviaturas.

Experiências com seres humanos e animais:

Trabalhos submetidos para avaliação pelo Conselho Editorial da *Revista HCPA* devem seguir os princípios relativos a experimentos com seres humanos e animais delineados nos seguintes documentos: *Declaration of Helsinki*, e *Guiding Principles in the Care and Use of Animals* (DHEW Publication, NIH, 80-23). Além destes documentos internacionais, deverão ser seguidas as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de

Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) e as resoluções normativas sobre pesquisa do HCPA. Os editores poderão recusar artigos que contrariem claramente os princípios delineados nestes documentos.

A compilação destas normas foi baseada em: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Can Med Assoc J* 1997;156(2):270-7.

REVISTA HCPA¹

¹The full version of this document is published once a year in the first issue of Revista HCPA. Information regarding manuscript submission and copies of the complete guidelines can also be obtained from the Internet at www.hcpa.ufrgs.br/revista/index or at Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

www.hcpa.ufrgs.br/revista/index

A quarterly journal published by Hospital de Clínicas de Porto Alegre since 1981.

Guidelines for manuscript submission

Contents of the Journal

Editorial. This section includes the Editor's comments regarding the contents of each issue, as well as the opinion of invited contributors regarding current topics or articles published in Revista.

Original articles. These are reports of original research presented so as to allow critical evaluation and duplication by other researchers. Articles submitted to this section can be observational, experimental, prospective or retrospective, descriptive or analytic. Manuscripts should not be longer than 20 pages.

Communications. Reports of preliminary results derived from ongoing observational or experimental research can be submitted to this section. Manuscripts should not be longer than 15 pages.

Special articles. These will be requested by the Editorial Board from invited contributors. Special articles cover current topics or

topics of permanent interest, including health policies, teaching, research, extra-curricular activities, and professional issues; also, clinical papers that express the experience of a group of professionals or the personal opinion of recognized professionals; and state-of-the-art reports on various fields. Special articles are not to exceed 25 pages.

Case studies. These describe new or unusual findings, or new insights regarding specific problems. Case studies must be succinct and are limited to a description of the facts observed. These contributions should not be longer than three pages, with a maximum of two illustrations and 15 references. Case studies are not a review of literature.

Grand Rounds. This section will bring a selection of relevant topics previously presented in Grand Rounds at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Letters to the Editor. Letters regarding previously published

papers or topics of interest. Not to exceed two pages.

Manuscript submission

Manuscripts submitted to *Revista HCPA* should be formatted following the Vancouver style (see *Can Med Assoc J* 1997;156(2):270-7). The Vancouver Group uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals can also be obtained from Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Authors will submit four copies of the manuscript along with a covering letter addressed to the Editor and a completed checklist. A copy of the checklist can be found after these instructions. Experimental papers will only be considered if authors include a copy of the written approval by the Ethics Committee of the institution in which the study was carried out. Manuscripts should be typed double-spaced, with 2.5 cm margins, on A4 (21 x 29.7 cm) paper. All pages must be numbered, beginning with the face

page. If possible, authors should use Arial size 11 font.

Articles can be submitted in Portuguese, English, or Spanish. Diskettes will only be requested from authors whose articles are accepted for publication. Collaborations should be mailed to:

Revista HCPA

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Largo Eduardo Zaccaro Faraco

CEP 90035-003

Porto Alegre, RS, Brazil

All articles will be reviewed by two referees. Articles sent back to the authors for additions will be re-evaluated by the Editorial Board prior to acceptance.

Face page

Manuscripts submitted to *Revista HCPA* must include a face page with the following information:

- Title;
- Full name of all authors with credentials and institution of affiliation;
- Up to five key words; the medical subject headings (MeSH) list of *Index Medicus* should be used. If suitable MeSH headings

are not yet available for recently introduced terms, present terms may be used.

- Complete address, telephone number, and email (if available) of the corresponding author.

Abstract

Original articles and communications must include a structured abstract, i.e., the abstract should describe objectives, methods, results, and conclusions, thus enabling readers to determine the relevance of the content of the article. Special articles and other collaborations must include descriptive abstracts of up to 200 words.

Body of the article

Original articles and communications must be organized according the "IMRAD" format: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion (or Discussion and Conclusions).

References

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Inside the text, references will appear in parentheses: "As several authors (1, 4, 7) have noted..." References which appear for the first time in tables or figures must be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the

particular table or figure.

Tables

Tables should be numbered consecutively using Arabic numerals (Table 1, Table 2, etc.). All tables must be mentioned in the text. Abbreviations should be explained in footnotes at the end of the table. For footnotes, use superscript letters.

Figures

Figures should be professionally drawn or printed on a laser printer. Good quality photographs can also be used. All figures must be cited in the text and numbered consecutively using Arabic numerals (Figure 1, Figure 2, etc.).

Abbreviations

Abbreviations should be avoided. However, if used, they should be introduced in parentheses immediately after the term they stand for, when it appears in the text for the first time. The title and the abstract should not contain abbreviations. In tables and figures, all abbreviations should be defined in footnotes or in the legend.

Human and animal experiments

Authors should follow the Declaration of Helsinki and the Guiding Principles in the Care and Use of Animals (DHEW

Publication, NIH, 80-23). The editors have the right not to accept papers if the principles described in these documents are not respected. In the case of experimental papers, the authors

should keep a copy of the written approval by the Ethics Committee of the institution in which the study was carried out.

Compilation of these guidelines

was based on: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Can Med Assoc J 1997;156(2):270-7.

REVISTA HCPA

LISTA DE ITENS PARA CONFERÊNCIA

Leia com cuidado as Normas para Publicação antes de completar a lista. Esta lista deve ser anexada ao artigo original e à versão revisada.

Nome do autor que recebe correspondência:

Data:

Telefone:

Fax/email:

Nome completo dos autores, seguidos de credenciais e instituição a que pertencem;

Até cinco unitermos;

Endereço completo, telefone e correio eletrônico do autor que recebe as correspondências.

CORPO DO ARTIGO

Tabelas numeradas com números arábicos. Todas as abreviaturas foram explicadas em notas no final das tabelas e indicadas por letras sobrescritas.

Figuras numeradas com números arábicos.

O texto inclui todos as divisões principais: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão (e, opcionalmente, Conclusões).

Nenhuma abreviatura está sendo utilizada no título ou no resumo.

No texto, termos abreviados são escritos por extenso na primeira vez em que aparecem, seguidos da abreviatura entre parênteses. As mesmas abreviaturas são usadas consistentemente em todo o texto, tabelas e figuras.

Pacientes são identificados por números, não por iniciais.

REFERÊNCIAS

A lista de referências começa em uma página separada. Todas as citações são indicadas no texto em números arábicos, na ordem em que aparecem, entre parênteses.

As referências foram conferidas e formatadas cuidadosamente. Os títulos de

periódicos foram abreviados conforme o Index Medicus.

O nome de todos os autores foi listado em cada uma das referências. Quando há mais de seis autores, os seis primeiros nomes foram citados, seguidos de *et al.*

FORMATO GERAL

O manuscrito está datilografado em espaço duplo, em folhas de tamanho A4 (21 x 29,7 cm), com margens de no mínimo 2,5 cm.

Quatro cópias do texto, tabelas e figuras estão sendo enviadas à *Revista HCPA*.

Esta lista foi preenchida, assinada por todos os autores e será enviada juntamente com as quatro cópias do texto e uma carta de apresentação dirigida ao Editor.

DIREITOS AUTORAIS

Ao assinar este formulário, os autores estarão cedendo os direitos autorais do artigo para a Revista HCPA. A publicação resumida deste artigo é permitida desde que a Revista seja citada, em nota de rodapé, como fonte original de publicação. No espaço abaixo, o nome de todos os autores deve constar de forma legível. Cada autor deverá assinar e datar este formulário.

REVISTA HCPA

CHECKLIST

Please read the guidelines for manuscript submission before completing this list. Attach the completed list to the original manuscript and to the revised version.

Corresponding author:

Date:

Telephone:

Fax/email:

FACE PAGE

- Title of the article;
- Full names of all authors, with credentials and institutional affiliation
- Up to five key-words;
- Full address, telephone and email of corresponding author.

BODY OF THE ARTICLE

- Tables are numbered with Arabic numerals. All abbreviations have been explained in notes at the end on the table and indicated with superscript letters.
- Figures are numbered with Arabic numerals.
- The text is organized

according to the IMRAD style.

- There are no abbreviations in the title or summary.
- In the text, terms to be abbreviated are written out the first time they appear, followed by abbreviation in parentheses. The same abbreviations are used consistently throughout the article, and in the tables and figures.
- Patients are identified by numbers, not by initials.

REFERENCES

- The reference list starts on a separate page. All citations are indicated in the text with Arabic numerals, in order of appearance.
- References were checked and carefully formatted. Titles of

journals were abbreviated according to the Index Medicus.

- The names of all authors were listed in each reference. When there are more than six authors, the six first names have been listed, followed by et al.

GENERAL FORMAT

- The manuscript is typed double-spaced on A4 (21 x 29.7 cm) pages with 2.5 cm margins.
- Four copies of the text, tables and figures are being sent to Revista HCPA.
- This list was completed and signed by all authors, and will be included with the copies of the manuscript and a covering letter addressed to the Editor.

COPYRIGHT

When signing this form authors will be transferring copyrights to Revista HCPA. Authors are allowed to submit a condensed version of this same article to other publications, provided that a footnote on the title page of the secondary version acknowledges that the paper has been published previously and states the primary reference. Below, please write the names of all authors. Each author must sign and date this form.

ÍNDICE DE AUTORES

REVISTA HCPA

Volume 21, n.1, 2001

A

Adamatti, Luis Carlos C. p. 7
Argenta, Rodrigo p. 7

B

Backes, Ariane Nadia p. 7
Bersch, Vivian P. p. 7, 28

C

Cavazzola, Leandro T. p. 13
Cersky, Carlos Thadeu S. p. 55
Costa, Mário Sérgio T. B. da p. 28

D

Dillenburg, Carlos F. p. 45, 59

F

Freitas, Daniel p. 7

G

Guimarães, José Ricardo p. 37
Gurski, Richard R. p. 13

H

Hauck, Simone p. 7

K

Kaminski, Eliane de Marco F. p. 86
Kruel, Cleber Dario P. p. 13, 45, 86

M

Marafon, Giancarlo p. 45
Meinhardt Jr., Jorge G. p. 7
Migliavacca, Alceu p. 37
Miotto, Gabriele C. p. 37
Moreira, Luis Fernando p. 59, 73
Mossmann, Diego da F. p. 7

N

Nhuch, Claudio p. 37

O

Osvoldt, Alessandro B. p. 7, 28

P

Passos, Eduardo P. p. 3
Pesce, Guilherme p. 13

R

Ramos, Maurício J. p. 7
Rohde, Luiz p. 5, 7, 28, 98
Rosa, André Ricardo P. da p. 13

S

Schier, André Silvio p. 45
Schirmer, Carlos C. p. 13
Schmitt, Caio da S. p. 37
Silva, Tiago Luís D. e p. 45
Silva, Vinícius D. da p. 55

T

Telles, João Pedro B. p. 13
Tiburi, Marcelo F. p. 73
Trindade, Manoel Roberto M. p. 55

V

Vieiro, Priscila F. p. 7
Viero, Priscila p. 28

W

Wendt, Luiz Roberto p. 28
Wolwacz Jr., Igor p. 55

Z

Zylbersztejn, Daniel S. p. 7

Revista HCPA

Volume 21, n.2, 2001

B

Biazús, Jorge V. p. 129, 151, 180, 185,
191, 198, 207, 219, 225, 229, 238
Bittelbrunn, Ana C. p. 151, 180, 185,
191, 198, 207, 225, 229, 238
Brenelli, Henrique B. 161

C

Calas, Maria J. G. p. 133
Caldoncelli, Valeska p. 133
Castiglione-Gertsch, Monica p. 168
Castro, Rosana de p. 133
Cavalheiro, José A. p. 151, 180, 185,
191, 198, 207, 225, 229, 238
Cericatto, Rodrigo p. 151, 180, 185,
191, 198, 207, 225, 229, 238
Cerski, Carlos T. p. 151

D

Dutra, Maria V. P. p. 133

K

Keppke, Edwald M. p. 161

M

Machado, Sérgio Eduardo p. 241
Manoel, Vânia R. p. 133
Medeiros, Roberto H. A. p. 140
Menke, Carlos H. p. 131, 151, 180,
185, 191, 198, 207, 225, 229, 238
Miele, Luciana p. 225, 238

N

Nasi, Laura p. 168
Nunes, Maria L. T. p. 140

P

Pasqualetto, Henrique A. P. p. 133
Passos, Eduardo P. p. 127
Pereira, Paulo M. S. p. 133
Pinotti, José A. p. 161

R

Rabin, Eliane G. p. 151, 180, 185,
191, 198, 207, 217, 225, 229, 238
Ruaro, Simone p. 225, 238

S

Santos, Cesar C. dos p. 161
Schermann, Lígia p. 140
Schuh, Fernando p. 219
Schwartzmann, Gilberto p. 151
Segal, Sandra L. p. 191
Silveira, Themis Reverbel da p. 245
Spiro, Bernardo L. p. 151

T

Torresan, Renato Z. p. 161

X

Xavier, Nilton L. p. 151, 180, 185, 191,
198, 207, 225, 229, 238

Z

Zucatto, Ângela E. p. 238

Revista HCPA

Volume 21, n. 3, 2001

A

Almeida Jr., Silvio L. W. p. 267

- B**
 Bacelar, Alexandre p. 267
 Barrios, Patrícia M. M. p. 301
 Barros, Sérgio G. S. p. 317
 Burin, Maira G. p. 286, 301, 343
 Burlamaque-Neto, Antônio C. p. 329
- C**
 Carvalho, Tiago S. p. 329
 Cecchin, Cláudia R. p. 387
 Cerski, Carlos T. S. p. 317
 Coelho, Janice C. p. 267, 276, 286, 343
- D**
 Dorfman, Luiza E. p. 267
- E**
 Erdtmann, Bernardo p. 267
- F**
 Fachel, Ângela A. p. 329
 Félix, Têmis M. p. 276
- G**
 Giugliani, Roberto p. 265, 286, 294, 343, 379
- H**
 Herman, Rafaela F. p. 301
- I**
 Ilha, Darcy O. p. 317
- J**
 Jaeger, Janaína P. p. 267
- K**
 Kessler, Rejane G. p. 301
- L**
 Leistner, Sandra p. 321, 329
 Leite, Júlio C. L. p. 276, 294
 Lima, Luciane C. p. 329
- M**
 Maciel, Antonio C. p. 317
 Maegawa, Gustavo H. B. p. 387
 Magalhães, José A. p. 301
 Maluf, Sharbel W. p. 267, 276
 Marchiori, Edson p. 317
 Matte, Úrsula p. 301, 321, 329, 379
 Morari, Liana p. 329, 265
- P**
 Passos, Eduardo P. p. 263
 Pereira, Maria L. S. p. 321, 329
 Peres, Rossana M. p. 361, 368
 Petry, Márcia G. p. 329
 Pires, Ricardo F. p. 387
- R**
 Riegel, Mariluce p. 267
- S**
 Sanseverino, Maria T. V. p. 301, 361, 368
 Santana, Valcinete F. p. 267
 Schüller-Faccini, Lavinia p. 361, 368
 Silva, Cláudia D. da p. 379
 Silva, Luiz C. S. da p. 329
 Souza, Ana P. B. p. 267
 Souza, Carolina F. M. p. 387
 Souza, Fernanda T. S. p. 286
 Stein, Nina Rodrigues p. 294, 301
 Streit, Carla p. 329
- T**
 Tarasconi, Dorvaldo P. p. 317
 Trombetta, Gisele B. p. 267
 Troviscal, Liliam Pontes p. 294
- V**
 Vargas, Carmem R. p. 286, 343
- W**
 Wajner, Moacir p. 265, 286, 343
- Z**
 Zandoná, Denise I. p. 387

ÍNDICE DE ASSUNTOS

Revista HCPA

Volume 21, n. 1, 2001

- A**
 Anastomose esofagogástrica p. 13
- B**
 Biologia Molecular p. 59
 Bócio p. 37
- C**
 Câncer de esôfago p. 45
 Câncer gástrico p. 73
 Câncer gastrointestinal p. 59
 Cirurgia de tireóide p. 37
 Cirurgia p. 3
 Colágeno p. 55
 Colectomia videolaparoscópica p. 7, 28
- D**
 Departamento de cirurgia p. 5
 Diagnóstico diferencial p. 28
 Dietilnitrosamina p. 45
 Dissertações p. 100
- E**
 Esofagostomia p. 13
- F**
 Fáscia p. 55
- H**
 HCPA p. 5, 7, 13, 28, 37
 Hérnia inguinal p. 55
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre p. 5, 7, 13, 28, 37
- M**
 Morfina p. 45
- N**
 Neoplasias esofágicas p. 13, 45
 Neoplasias gástricas p. 73
 Neoplasias gastrointestinal p. 59
- P**
 Panoite aguda p. 28
 Pós-graduação p. 3, 98
- S**
 Serviços de Especialidades Cirúrgicas p. 5
- T**
 Tireóide p. 37
 Tireoidectomia p. 28

- V**
Vesícula biliar p. 7
- Revista HCPA**
Volume 21, n. 2, 2001
- A**
Aconselhamento genético p. 191
Assistência paliativa p. 140
- B**
Biópsia p. 133
Biópsia de linfonodo sentinela p. 151
- C**
Câncer da mama p. 127, 133, 140, 151, 161, 168, 180, 185, 191, 198, 207, 229
Carcinoma *in situ* p. 133, 219
Centro de pesquisa p. 241
Condições pré-cancerosas p. 229
- D**
Doença de Mondor p. 238
Dor p. 225
Dor pós-operatória p. 140
- F**
Flebite p. 238
- G**
Genes supressores de tumor p. 191
Genética p. 191
- H**
HCPA p. 127, 129, 241, 245
Herpes zoster p. 238
Hospital de Clínicas de Porto Alegre p. 127, 129, 241, 245
- M**
Mamografia p. 229
Mamoplastia p. 161
Mastectomia p. 133, 140, 185
Mastectomia segmentar p. 198
Mastologia p. 127
Metástase p. 151
- N**
Neoplasias mamárias p. 127, 133, 140, 151, 161, 168, 180, 185, 191, 198, 207, 229
- P**
Prevenção primária p. 185
- Q**
Qualidade de vida p. 217
- R**
Reabilitação p. 217
Recidiva p. 198, 217
- S**
Serviço de Mastologia p. 127, 129
- T**
Terapia p. 219
Terapia neoadjuvante p. 168, 207
- Revista HCPA**
Volume 21, n. 3, 2001
- A**
Aconselhamento genético p. 301, 361, 368
Análise citogenética p. 267, 321, 329
Anormalidades p. 294, 301, 361, 368
Antinoplásicos p.
- B**
Biologia molecular p. 321, 329
Biópsia por agulha p. 317
- C**
Cirrose hepática p. 317
- D**
Desenvolvimento fetal p. 368
Diagnóstico pré-natal p. 301
DNA p. 265
Doenças genéticas inatas p. 265, 321, 329, 379, 387
DPN p. 301
- E**
ECLAMC p. 294
Ensaio em cometa p.
- Erros inatos do metabolismo p. 286, 301, 387
Estudo Colaborativo Latino-americano de Malformações Congênitas p. 294
- F**
Fibrose hepática p. 317
- G**
Genética bioquímica p. 286
Genética p. 263
Genômica p.
Gravidez p. 368
- H**
HCPA p. 263, 265, 329
Hospital de Clínicas de Porto Alegre p. 263, 265, 329
- N**
Neoplasias p. 379
- P**
Poluentes ambientais p. 368
Porto Alegre p. 361
Prevenção primária p.
Programa de Diagnóstico Pré-natal p. 301
Programa de Monitoramento de Defeitos Congênitos p. 294
Projeto Genoma Humano p. 265
Protocolos clínicos p. 379
- R**
Retardo mental p. 267
- S**
Serviço de Genética Médica p. 263, 265, 329
SIAT p. 361
Sistema Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos p. 361
- T**
Terapia de genes p. 379
Teratogênicos p. 368
Testes para micronúcleo p.
Tratamento p. 387
- V**
Veias jugulares p. 317

