

Rastreio neonatal dos défices do ciclo da ureia em Portugal

Newborn screening for urea cycle disorders in Portugal

Hugo Rocha, Carmen Sousa, Helena Fonseca, Ana Marcão, Lurdes Lopes, Ivone Carvalho, Laura Vilarinho

hugo.rocha@insa.min-saude.pt

Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, INSA, Porto.

_Resumo

Os défices do ciclo da ureia são um grupo de doenças hereditárias do metabolismo caracterizadas fundamentalmente por uma acumulação de amónia. Clinicamente o espectro é muito alargado, com formas de apresentação no período neonatal até situações mais moderadas de apresentação tardia em adultos. O tratamento é fundamentalmente de base nutricional e traduz-se numa redução significativa da mortalidade e morbidade. Com a introdução da espectrometria de massa nos laboratórios de rastreio neonatal em meados dos anos 90, passou a ser possível quantificar alguns intermediários do ciclo, o que associado à existência de um intervalo livre e um tratamento eficaz, permitiu o rastreio de algumas das doenças deste grupo. Em 2004 iniciou-se em Portugal o rastreio dos défices do ciclo da ureia, tendo-se rastreado até ao presente, 988 687 recém-nascidos e identificado 19 casos positivos. Recentes desenvolvimentos técnicos vieram possibilitar a quantificação de novos marcadores, mais concretamente do ácido orótico, o que abre a possibilidade de rastrear o défice em ornitina transcarbamilase, o défice do ciclo da ureia mais frequente. Os autores apresentam a situação atual do rastreio dos défices do ciclo da ureia e as perspetivas em virtude dos novos desenvolvimentos técnicos.

_Abstract

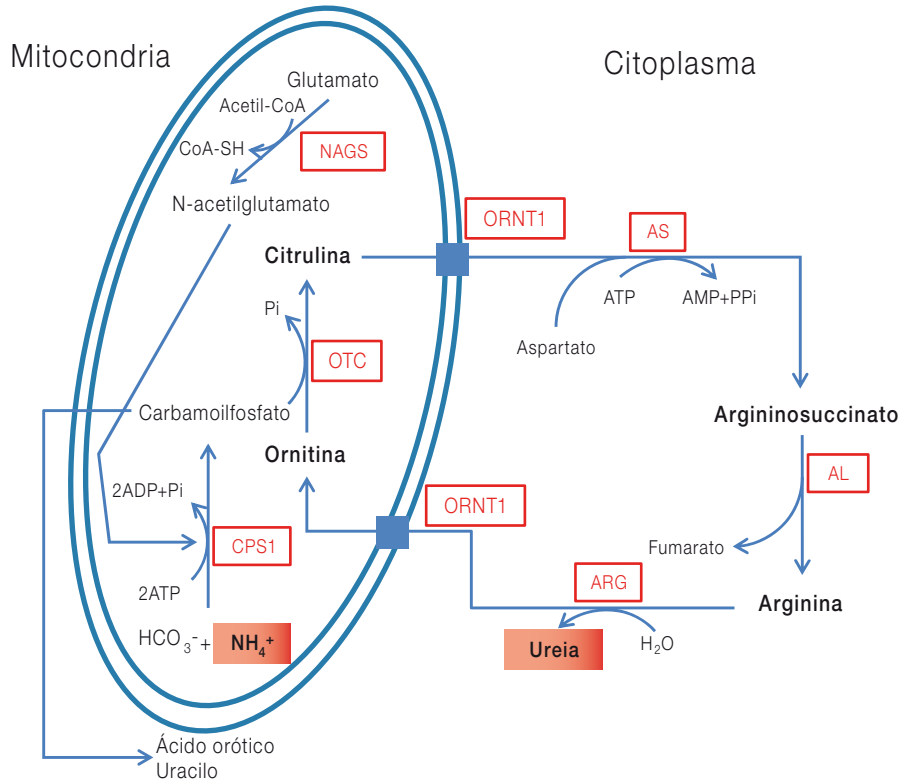
Urea cycle disorders (UCDs) are a group of inborn errors of metabolism characterized by ammonia accumulation. The clinical spectrum is very heterogeneous and ranges from neonatal presentations to almost asymptomatic adults. Treatment is mainly based on a protein-restricted diet and results in a significant decrease of mortality and morbidity. The introduction of tandem mass spectrometry-based techniques in newborn screening laboratories in the middle 90's has allowed to detect and quantify several intermediates of the cycle, and this, alongside with the existence of a symptom-free interval after birth and effective treatment, allowed to screen for some UCDs. Since 2004, the Portuguese newborn screening program for UCDs has analyzed 988 687 newborns and 19 positive cases were detected. Recent technical developments allow quantifying other UCDs markers on Guthrie cards, more precisely orotic acid which opens the possibility to screen for ornithine transcarbamylase deficiency, the most common UCD. The authors will review the current status of the newborn screening for UCDs and present future perspectives.

_Introdução e objetivo

O catabolismo dos aminoácidos e em menor quantidade as bactérias intestinais, produzem amónia, que por sua vez pode ser reutilizada na síntese de *novo* de aminoácidos assim como de outros produtos nitrogenados. A sua acumulação, quer seja devida a um excesso de produção quer a uma deficiente excreção, conduz a uma situação clinicamente relevante que é a hiperamonemia. A acumulação de amónia a nível cerebral é tóxica, possuindo o organismo humano dois mecanismos principais de desintoxicação: uma passa pela conversão da amónia em glutamina e o segundo, mais relevante, é a sua conversão em ureia, molécula não tóxica, através do ciclo da ureia. Este ciclo é uma via metabólica que ocorre entre a mitocôndria e o citoplasma e é composto por um conjunto de quatro reações enzimáticas. A amónia é inicialmente metabolizada na mitocôndria, por ação da carbamoilfosfato sintetase 1, em carbamoilfosfato que por sua vez entra no ciclo por ação da enzima ornitina transcarbamilase. Em cada ciclo, dois átomos de azoto dão origem a uma molécula de ureia (figura 1).

Disfunções do ciclo da ureia devidas a défices congénitos das enzimas que catalisam as várias reações do ciclo, do transportador mitocondrial da citrulina/ornitina, da NAGS ou da CPS1, conduzem às hiperamonemias primárias (1). No entanto, a amónia pode também acumular-se devido a outras causas, como inibições das atividades enzimáticas do ciclo devido a compostos tóxicos, défices de substratos do ciclo (devidos a algumas acidúrias orgânicas, défices da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos ou terapia com valproato de sódio) e ainda insuficiências hepáticas graves, sendo designadas de hiperamonemias secundárias (1).

Figura 1: Esquema representativo do ciclo da ureia.



NAGS – N-acetilglutamato sintetase; CPS1 – carbamoilfosfato sintetase 1; AS – arginossuccinato sintetase; AL – arginossuccinato liase; ARG – arginase; OTC–ornitina transcarbamilase; ORNT1 – transportador mitocondrial da ornitina/citrulina.

Estão descritos sete défices primários do ciclo da ureia (tabela 1), sendo que todos apresentam um modo de transmissão autossómico recessivo, com exceção do défice em OTC, que é ligado ao cromossoma X (1).

As formas clássicas, com exceção das da Argininemia, incluem uma apresentação aguda no período neonatal com sonolência, letargia, vômitos, convulsões e rápida progressão para coma (1). A Argininemia tem classicamente uma apresentação entre o segundo e quarto ano de idade, estando no entanto, descritas formas raras de apresentação neonatal, nomeadamente na população portuguesa (2). Uma vez que são doenças de intoxicação, a existência de um período

pós-natal assintomático, de duração variável, designado de intervalo livre, é uma característica deste grupo de patologias. As formas menos graves tendem a ter uma apresentação mais tardia e geralmente estão associadas a défices enzimáticos menos graves (3).

Tabela 1: Défices primários do ciclo da ureia.

Défice do ciclo da ureia	#MIM	Gene
Défice em N-acetilglutamato sintetase (NAGS)	237310	NAGS
Défice em carbamoil-fosfato sintetase I (CPS I)	237300	CPS1
Défice em ornitina transcarbamilase (OTC)	311250	OTC
Défice em arginossuccinato sintetase (Citrulinemia tipo I; CIT I)	215700	ASS1
Défice em arginossuccinato liase (Acidúria arginossuccinica; ASL)	207900	ASL
Défice em arginase (Argininemia; ARG)	207800	ARG1
Défice em ORNT1 (Hiperornitinemias-Hiperamonemias-Homocitrulinúria; HHH)	238970	ORNT1

O tratamento deste grupo de patologias é fundamentalmente de base nutricional, com uma limitação do aporte proteico e uma restrição do catabolismo com a estimulação do anabolismo (1). Por vezes, o tratamento contempla a suplementação com os intermediários do ciclo que eventualmente estejam deficitários (ex. arginina e citrulina) e ainda a utilização de fármacos desintoxicantes como por exemplo o benzoato de sódio ou fenilbutirato de sódio. Em algumas situações, o transplante hepático é considerado o tratamento de eleição (4).

Perante uma suspeita clínica de um défice do ciclo da ureia, o diagnóstico é feito recorrendo ao doseamento de marcadores bioquímicos (tabela 2), determinação da atividade enzimática residual e estudos moleculares.

É reconhecido que uma deteção e tratamento precoces, durante o período neonatal, são fundamentais para prevenir a progressão dos sintomas neste grupo de patologias (5, 6). Com a introdução da espectrometria de massa em tandem (ms/ms) nos laboratórios de rastreio neonatal, passou a ser possível o doseamento, em sangue colhido em papel nos primeiros dias de vida, de vários intermediários do ciclo da ureia (7). Esta possibilidade, associada à existência de um intervalo livre e de terapia eficaz, fez com que algumas patologias deste grupo fossem sendo progressivamente incluídas em diferentes programas de rastreio neonatal (8).

Os autores apresentam os resultados do rastreio neonatal dos défices do ciclo da ureia em Portugal.

_Material e métodos

As amostras de recém-nascidos portugueses foram colhidas entre o 3º e 6º dia para cartões de Guthrie, com papel de filtro Whatman 903, no âmbito do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce.

Dois MS/MS, um API2000 e um API QTRAP 4500 (ABSciex) são utilizados no nosso laboratório para efetuar a análise dos recém-nascidos, de acordo com o método anteriormente publicado (9). Esta abordagem possibilita o doseamento da citrulina, arginina, ornitina e ácido argininosuccínico, que permitem o rastreio neonatal da Citrulinemia tipo I, da Argininemia e da Acidúria argininosuccínica (7, 10).

_Resultados

O rastreio sistemático alargado a estas patologias teve o seu início em Portugal em 2004, tendo-se desde então rastreados 988.687 recém-nascidos e identificado 19 casos positivos. Foram identificados dez casos de Citrulinemia tipo I, quatro casos de Acidúria argininosuccínica e cinco casos de Argininemia, com as prevalências ao nascimento de 1: 98 869, 1: 247 172 e 1: 197 737, respetivamente.

_Discussão e conclusão

De entre os défices do ciclo da ureia rastreados o mais prevalente ao nascimento é a Citrulinemia tipo I, sendo a Acidúria argininosuccínica e Argininemia mais raras. O sucesso do rastreio destas patologias tem sido considerável, no entanto o rastreio dos défices do ciclo da ureia ainda apresenta alguns desafios.

Tabela 2: ⚡ Marcadores bioquímicos de diagnóstico dos défices do ciclo da ureia.

Doença	Citrulina	Ácido argininosuccínico	Arginina	Ornitina	Ácido orótico
NAGS	N - ↓	ND	N - ↓	N	N-↓
CPS I	N - ↓	ND	N - ↓	N	N-↓
OTC	N - ↓	ND	N - ↓	N	N-↑↑↑
CIT I	↑↑↑	ND	N - ↓	N	N-↑↑
ASL	↑	↑↑↑	↓	N	N-↑
ARG	↑	ND	↑↑↑	N	N-↑
HHH	N	ND	N	↑↑	N-↑

N - Normal; ND - Não detetável

A doença do ciclo da ureia mais frequente e uma das mais graves, é o défice em OTC, que é recorrentemente apontado com sendo uma das patologias com potencial para ser incorporado no painel de doenças a rastrear. No entanto, a inexistência de um marcador suficientemente sensível e específico vem adiando a sua inclusão (5).

O défice em OTC apresenta um modo de transmissão ligado ao cromossoma X e apresenta uma grande variabilidade clínica, mesmo nos doentes do sexo feminino, podendo apresentar-se como uma forma neonatal grave ou como uma forma de apresentação mais tardia, normalmente de menor gravidade (5). A deficiência em OTC resulta numa diminuição da citrulina, no entanto esta não é suficientemente específica e sensível para poder ser utilizada como marcador primário de rastreio (11).

Foi recentemente publicada a possibilidade de quantificação do ácido orótico em sangue em papel, por MS/MS, com prova de segundo nível (12, 13). O ácido orótico aumenta nos défices do ciclo da ureia em consequência de um aumento do carbamoilfosfato, que é redirecionado para a via de biossíntese das pirimidinas (14). A combinação de valores baixos de citrulina, com o aumento do ácido orótico, poderá ser utilizada como marcador no rastreio desta patologia.

Estes desenvolvimentos apontam para a possibilidade do rastreio neonatal sistemático do défice em OTC e nesse sentido será brevemente implementado, no âmbito do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce, o doseamento do ácido orótico em cartão de Guthrie, de forma a avaliar a possibilidade de rastreio desta patologia na população portuguesa.

Agradecimentos:

Parte deste trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto "Atualização tecnológica do Programa Nacional de Diagnóstico Precoce" (Operação NORTE-07-0162-FEDER-000142), financiado pelo programa ON2-QREN.

Referências bibliográficas:

- (1) Haberle J, Rubio V. Hyperammonemias and related disorders. In: Blau N, Duran M, Gibson KM, et al. (eds). Physician's guide to the diagnosis, treatment, and follow-up of inherited metabolic diseases. New York: Springer, 2014, p. 47-62.
- (2) Gomes Martins E, Santos Silva E, Vilarinho S, et al. Neonatal cholestasis: an uncommon presentation of hyperargininemia. *J Inher Metab Dis*. 2010;33(suppl 3):S503-6. Epub 2011 Jan 13.
- (3) Sanjurjo P, Rubio V. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del ciclo de la urea. In: Sanjurjo P, Baldellou A. (eds). Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditárias. 4ª ed. Madrid: Ergon, 2014.
- (4) Silva ES, Cardoso ML, Vilarinho L, et al. Liver transplantation prevents progressive neurological impairment in argininemia. *JIMD Rep*. 2013;11:25-30. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755545/
- (5) Brusilow SW, Horwich AL. Urea cycle enzymes. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, et al. (eds). The online metabolic and molecular bases on inherited disease. New York: McGraw-Hill, 2006.
- (6) Walker V. Ammonia toxicity and its prevention in inherited defects of the urea cycle. *Diabetes Obes Metab*. 2009;11(9):823-35.
- (7) Zytovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem*. 2001;47(11):1945-55. www.clinchem.org/content/47/11/1945.long
- (8) Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1. From blood spot to screening result. *J Inher Metab Dis*. 2012;35(4):603-11.
- (9) Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem*. 2003;49(11):1797-817. www.clinchem.org/content/49/11/1797.long
- (10) Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, et al. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis*. 2010;33(suppl 3):S133-8.
- (11) Cavicchi C, Malvagia S, la Marca G, et al. Hypocitrullinemia in expanded newborn screening by LC-MS/MS is not a reliable marker for ornithine transcarbamylase deficiency. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;49(5):1292-5.
- (12) Held PK, Haynes CA, De Jesús VR, et al. Development of an assay to simultaneously measure orotic acid, amino acids, and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin Chim Acta*. 2014;436:149-54. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835024/
- (13) Janzen N, Terhardt M, Sander S, et al. Towards newborn screening for ornithine transcarbamylase deficiency: fast non-chromatographic orotic acid quantification from dried blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2014;430:28-32. Epub 2013 Dec 25.
- (14) Salerno C, Crifó C. Diagnostic value of urinary orotic acid levels: applicable separation methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;781(1-2):57-71.