

# DOENÇAS HEREDITÁRIAS DAS PURINAS E PIRIMIDINAS

## Estado da arte. Contribuição para o diagnóstico\*

LUÍSA DIOGO, TERESA PROENÇA, PAULA GARCIA, CATARINA OLIVEIRA, ANNE SIMMONDS

Unidade de Doenças Metabólicas. Coimbra. Hospital Pediátrico de Coimbra. Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra. Purine Research Unit - Guy's Hospital Londres. Inglaterra.

### RESUMO

Os defeitos congénitos do metabolismo das purinas e pirimidinas constituem um subgrupo de doenças hereditárias do metabolismo de tradução clínica muito variada. Podem envolver os sistemas nervoso, renal, hematológico e/ou imunitário e apresentar-se em qualquer idade. Não é conhecida a incidência e prevalência destas doenças. A maior parte dos clínicos não está familiarizado com as mesmas e os laboratórios hospitalares não oferecem meios para a realização do seu rastreio bioquímico.

Colaborámos recentemente num estudo europeu relativo a esta patologia, no âmbito do qual foi possível reunir as condições para o rastreio urinário dos metabolitos púricos e pirimídicos e o estabelecimento dos valores normais para a população pediátrica na zona centro do País.

*Palavras-chave: Doenças hereditárias do metabolismo das purinas e pirimidinas; rastreio urinário.*

### SUMMARY

#### **INHERITED DISORDERS OF PURINE AND PYRIMIDINE METABOLISM**

State of art. Contribution for diagnosis

Inherited errors of purine and pyrimidine metabolism are a group of disorders with a broad spectrum of clinical manifestations. They may involve nervous, renal, haematological and immunological systems, presenting at any age. The incidence and prevalence of these disorders are unknown. Most clinicians are not aware of their existence and hospital laboratories do not offer conditions for the screening.

We have been associated contractor in an european project for the study of these disorders. It enabled us to set up urinary screening methods and establish normal values for urinary purine and pyrimidine in our paediatric population.

*Key words: Inherited errors of purine and pyrimidine metabolism; urinary screening*

\* Este trabalho teve o apoio de EC Grant BMH4-CT8- 3079

## INTRODUÇÃO

As doenças hereditárias do metabolismo das purinas e pirimidinas (DHM P&P) constituem um subgrupo de doenças genéticas de tradução clínica muito variada. Conhecem-se actualmente 23 défices enzimáticos, maioritariamente descritos nos últimos 25 anos, 17 dos quais estão na origem de quadros graves que podem envolver o sistema nervoso, renal, hematológico e/ou imunitário. Podem revelar-se em qualquer idade, com um largo espectro de formas de apresentação, desde litíase úrica, imunodeficiência, atraso mental, epilepsia, síndrome piramidal, alterações do comportamento, dismorfismo, anemia, ou mesmo reacções catastróficas a terapêuticas com antimetabolitos. (Simmonds 1996; Van den Berghe 2000) (quadros I- II)

**Quadro I: DHM PURINAS - diagnóstico clínico-laboratorial**

DEFICIT	CLÍNICA	URINA	PLASMA	NUCL.GV	ENZIMAS
Adenosina desaminase (ADA)	ADA: Imunodeficiência combinada severa (linfopenia e hipogamaglobulinémia)	dAdo +++		dATP ++++	Eritrócitos <
2- Purina-nucleosido fosforilase (PNP)	Imunodeficiência celular + Neurológico	Ácido úrico << Ino Guo dlno dGuo ++	Ac úrico << Ino Guo dlno dGuo +++	dGTP +++	Eritrócitos <
3- Xantina desidrogenase (oxidase) (XDH) a) isolada b) associada a défice de sulfito oxidase -SO- (por défice do cofactor do molibdénio- Mo-)	a) litíase xantínica- insuficiência renal b) Neurológico NN + Ocular	a), b) Ácido úrico << Hipox. Xan >>	a),b) Ácido úrico << Hipox. Xan >		a) < SDH Fígado, Mucosa intestinal b) <SO, Mo Fígado, Fibroblastos
4- Hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT)	Neurológico + Renal Total - Lesch-Nyhan Parcial - gota; por vezes + neurológico	Ácido úrico >> Hipox. >	Ácido úrico N/ >	Nucleótidos >	Eritrócitos <
5- Adenina- fosforibosil transferase (APRT)	Renal (litíase 2-8-DHA)	Adenina > 2,8DHA >			Eritrócitos <
6- Adenilsuccinato liase (ADSL)	Neurológico	S-Ado >> SAICAr >>	S-Ado >> SAICAr >> (e líquor)		< Fígado, Rim
7- Mitocondriodesaminase (MAD)	Muscular. Ocasionalmente cardíaco		Por vezes > creatina-quinase		Músculo <
8- Fosforibosilpirofosfato sintetase (PRPS) - superactividade	Neurológico Surdez Renal	Ácido úrico >> Hipox. >	Ácido úrico > (por vezes N)	PRPP >	Eritrócitos Fibroblastos >

**Legenda**  
dAdo - desoxiadenosina; dATP - desoxiadenosinatrifosfato; Ino - inosina; Guo-guanosina; dlno - desoxiinosina; dGuo - desoxiguanosina; dGTP - desoxiguanosinatrifosfato; Hipox. - hipoxantina; Xan - xantina; 2,8DHA - 2,8-dihidroxiadenina

**Quadro II: DHM PIRIMIDINAS - diagnóstico clínico-laboratorial**

DEFICIT	CLÍNICA	URINA	PLASMA	NUCL.GV	ENZIMAS
9- Uridina-monofosfato sintetase (UMPS)	Anemia megaloblástica + Cristaluria + Atraso crescimento e psicomotor	Acido orotico >>>>	Acido orotico >>	nucleótidos pirimidina <	Eritrócitos <
Aciduria orotica hereditária					
10- Pirimidina-nucleotidase (UMPase)	Anemia hemolítica crónica não esférica; stipling dos basófilos	Uracilo >> Timina >>	? -alamina <	nucleótidos pirimidina >>	Eritrócitos, Fígado <
Adquirido- intox Pb					
11- Dihidropirimidina desidrogenase (DPD)	Neurológico + dismorfia, microcefalia	Uracilo > Timina >	Uracilo > Timina > (e líquor)		Fibroblastos, Leucócitos <
12- Dihidropirimidina amidohidrolase ou dihidropirimidase (DPA)	Neurológico + ocasional dismorfia, microcefalia	Uracilo > Timina > Dihidroureacil /timina >>	? -alamina <		Fígado

Pode considerar-se três níveis de diagnóstico nas DHM P&P: 1 - análise dos perfis de excreção urinária de metabolitos, nomeadamente por HPLC fase reversa com determinação UV de múltiplo comprimento de onda; 2- doseamento dos nucleótidos em eritrócitos e estudo

enzimático em eritrócitos, biópsia hepática, intestinal ou em cultura de fibroblastos; 3 - estudo molecular.

## MATERIAL E MÉTODOS

Participámos recentemente como colaborador associado português no projecto - GRUPO EUROPEU PARA A COORDENAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO E DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS HEREDITÁRIAS DAS PURINAS E PIRIMIDINAS, coordenado por Anne Simmonds - Purine Research Laboratory - Guy's Hospital Londres. Tratou-se de um projecto com a duração de três anos e cujo objectivo foi desenvolver uma rede de laboratórios na Europa, de modo a que em cada país seja possível rastrear as DHM P&P. No âmbito do mesmo, foi montada a tecnologia para o doseamento urinário dos metabolitos púricos e pirimídicos e o estabelecimento dos valores normais para a população pediátrica entre um mês e os 16 anos, servida pelo nosso Hospital.

A caracterização bioquímica dos doentes seleccionados inclui a avaliação do perfil de excreção dos metabolitos púricos e pirimídicos em amostra de urina ao acaso e sob dieta normal.

A análise foi feita por HPLC em fase reversa com coluna Hypersil ODS 5µm (250 x 3,2 mm) da Jones Chromatography. O equipamento computadorizado Gilson compreende Detector Diode Array modelo 170, Autoinjector modelo 234 e Sistema de Bombagem modelo 321.

A separação cromatográfica dos metabolitos é efectuada utilizando Tampão A (acetato de amónio 40 mM, pH 5) e Solução B (metanol: acetoneitrilo: tetrahydrofurano nas proporções 80:10:10) segundo gradiente linear durante 30 minutos desde 0 até 30% do solvente orgânico, mantendo o fluxo 0,5 ml/minuto, seguido de 10 minutos de estabilização com 100% de tampão, antes de nova injeção.

A detecção é processada em ultra-violeta, 254 e 280 nm, sensibilidade 0,05 AUFs, e a identificação dos picos baseada na leitura dos tempos de retenção e análise das curvas de absorção, características de cada metabolito, observáveis pelo sistema diode array.

Cada amostra de urina é analisada globalmente (diluída 1/30 em água ultra-pura) e após purificação/separação cromatográfica em resina trocadora de aniões AG 1- X 8, 100-6868200 mesh, forma acetato (Bio- Rad UK Ltd Watford). São obtidas, deste modo, seis fracções contendo cada uma parte da totalidade dos metabolitos urinários.

## RESULTADOS

Foram analisadas e quantificados relativamente à

creatinina os metabolitos púricos e pirimídicos em amostras de urina de 58 crianças e adolescentes com idades entre um mês e os 16 anos, sem clínica enquadrável nos défices do metabolismo das bases púricas e pirimídicas conhecidos. (Quadros III)

Quadro III: perfil urinário dos metabolitos púricos e pirimídicos em crianças e adolescentes - n=58

Idade	Idade	Ácido úrico (mM)	Creatinina (mM)	Ácido úrico/creatinina (mM/mM)	Ácido úrico/creatinina (µM/mM)	Hipoxantina/creatinina (µM/mM)	Xantina/creatinina (µM/mM)	Total oxipurinas/creatinina (µM/mM)	Uracilo/creatinina (µM/mM)	Pseudouridina/creatinina (µM/mM)	7-metilguanina/creatinina (µM/mM)		
Reso (26 M; 17F) N= 33	> 2 A	Média (anos) (SD)	6,7 (3,2)	3,3 (1,6)	6,1 (3,9)	0,6 (0,2)	543,5 (187,4)	14,6 (8,2)	11,2 (7,9)	568,4 (195,7)	4,3 (3,2)	52,8 (22,1)	5,9 (3,0)
N=15	≤ 24 M	Média (meses) (SD)	13,2 (8,4)	2,5 (1,5)	3,0 (1,9)	0,9 (0,3)	852,2 (292,4)	17,0 (7,7)	16,2 (11,2)	880,8 (301,0)	9,4 (-)	103,7 (30,2)	11,5 (6,6)

## DISCUSSÃO

Não é conhecida a incidência e prevalência das doenças hereditárias do metabolismo das purinas e pirimidinas. A maior parte dos clínicos não está familiarizado com as mesmas e os laboratórios hospitalares, com excepção para os casos que cursam com alterações dos níveis de ácido úrico, não têm meios para a realização do seu rastreio bioquímico.

Por outro lado, são bem conhecidas variações dos teores urinários dos metabolitos P&P em função do tipo de dieta. (Yamamoto T 1996 Jeevanandam M 1985), pelo que se torna necessário estabelecer valores normais regionais.

Temos actualmente em curso o estabelecimento de valores normais de excreção urinária destes metabolitos para os grupos etários acima dos 16 anos.

Em qualquer idade, mas com mais pertinência na criança, a comodidade do uso de uma amostra de urina em vez da colheita de 24 horas é óbvia. Assim, apenas nos casos em que há uma suspeita clínica forte e o rastreio urinário é positivo, se passará ao estudo da urina de 24 horas (precedida ou não de dois dias de dieta pobre em purinas) e eventualmente a níveis de diagnóstico mais elevados. No mínimo aconselha-se a evicção de bebidas com metilxantinas 1-2 dias antes e durante a colheita.

A análise do perfil urinário dos metabolitos púricos e pirimídicos e consequente estudo enzimático e molecular não se limitam ao estudo das doenças hereditárias daquele metabolismo. De facto, constituindo uma forma de abordagem dos mecanismos de proliferação celular e seu controlo, encontram um vastíssimo campo de aplicação em oncologia e quimioterapia.

## BIBLIOGRAFIA

1. SIMMONDS HÁ: Purine and pyrimidine disorders. In: N Blau, M Duran and M E Blaskovics, eds. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. London: Chapman and Hall Medical 1996: 341-57
2. VAN DEN BERG G, VINCENT M-F AND MARIE S: Disorders of purine and pyrimidine metabolism. In: J. Fernandes, J.-M. Saudubray and G.van den Berghe, eds. Inborn Metabolic Diseases-diagnosis and treatment. Berlin: Springer 2000: 354-68
3. YAMAMOTO T, MORIWAKI Y, TAKAHASHI S, et al: Difference of the plasma concentration and urinary excretion of allopurinol, oxypurinol, and purine bases between dietary intake and fasting. Int J Clin Pharmacol Ther 1996; 34 (4): 157-62
4. JEEVANANDAM M, SHOEMAKER JD, HOROWITZ GD, and al: Orotic acid excretion during starvation and refeeding in normal men. Metabolism 1985; 34(4): 325-9
5. ASAI M, SUMI S, KIDOUCHI K et al ( ) Urinary pyrimidine analysis in healthy newborns, infants , children and adults and patients with congenital metabolic diseases. Pediatr Int 2000; 42 (5): 499-503
6. VAN DEN BERGH F A, BOSSCHAART A N, Hageman and al: Adenylsuccinase deficiency with neonatal onset severe epileptic seizures and sudden death. Neuropediatrics 1998; 29 (1): 51-3
7. ITO T, VAN KUILENBURG AB, BOOTSMA AH et al: The application of HPLC/ESI tandem mass spectrometry on urine-soaked filter- paper strips for the screening of disorders of purine and pyrimidine metabolism. J Inherit Metab Dis 2000; 23 (4): 434-7
8. DURAN M, DORLAND L, MEULEMAN EE, et al: Inherited defects of purine and pyrimidine metabolism: laboratory methods for diagnosis. J Inherit Metab Dis 1997; 20 (2): 227-36
9. Grobner W, Zollner N: The influence of dietary purines and pyrimidines on purine and pyrimidine biosynthesis in man Nutr Metab 1977; 21 (1-3): 26-32