



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM
DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE BORDO**

ALUNA: Ana Facury da Cruz

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Eugênia Ribeiro Valadares

Belo Horizonte

2014

ANA FACURY DA CRUZ

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM
DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE BORDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eugênia Ribeiro Valadares

Belo Horizonte

2014

Dedico este trabalho a todos os pacientes com MSUD e suas famílias e aos meus pais, pela presença constante e pelo apoio em minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Teodoro e Marta, pela confiança em mim, por me apoiarem e acreditarem no meu trabalho, sempre me estimulando a ir além. Aos meus avós, tios e primos pelo carinho de sempre. Ao meu irmão, Daniel, pelo cuidado e pelas conversas e conselhos. Ao meu sobrinho, Antônio, que já enche de alegria os meus dias. Aos meus padrinhos, tio Elias e tia Cris, grandes exemplos de pessoas e de profissionais. Ao Pedro, que me acompanha desde a decisão de iniciar o mestrado e faz meus dias mais leves, agradeço pelo amor, conselhos e, acima de tudo, pela compreensão. Vocês todos foram essenciais!

A minha orientadora, Prof^ª. Eugênia Valadares, por ter me acolhido de braços abertos no ambulatório e por todo o conhecimento adquirido desde então. Obrigada pela oportunidade, pela confiança em meu trabalho e pela amizade. A todos os residentes e funcionários do ambulatório, agradeço o apoio e a troca de conhecimentos.

À nutricionista Viviane Kanufre que desde a graduação acompanha meus passos e me abre portas. Obrigada por todas as oportunidades, pelos ensinamentos no tratamento dos erros inatos do metabolismo e, acima de tudo, por me apresentar a beleza do trabalho em pediatria. Agradeço, também, a todos os colegas do HC-UFMG, pelo acolhimento na convivência diária.

Aos colegas e amigos Talita e Rodrigo que dividiram comigo momentos e conhecimentos preciosos. Agradeço pela paciência, pelos ensinamentos e pelo companheirismo em todos os momentos. Aprendi muito com cada um de vocês e me faltam palavras para agradecer. O carinho de vocês na trajetória deste trabalho deixou tudo mais fácil.

Às amigas Luiza, Fernanda, Bárbara, Joyce e Érica, agradeço o apoio pessoal e profissional. Vocês estão sempre comigo!

À equipe do Laboratório de EIM (HC-UFMG) e a todos que por lá passaram, Selme, Erika Neves, Daniela Nolasco e Prof^ª. Josianne Nicácio agradeço pelos conhecimentos e todo o esforço empenhado na padronização da técnica de HPLC.

À equipe do Laboratório Hermes Pardini, em especial, à Tatiana Campos pelas dosagens de aminoácidos. Agradeço seu apoio, disponibilidade, atenção e preocupação com os pacientes.

Pela ajuda nas análises estatísticas agradeço à Grazielle Umbelina, ao Dr. William Pedrosa e ao Prof. Idalmo Garcia. A todos os funcionários do UFPML-HC-UFMG pela ajuda na seleção e coleta de amostras do grupo controle.

Aos pacientes com MSUD, aos voluntários e seus familiares, agradeço pela disponibilidade em participar do estudo. Obrigada pelo carinho, pela convivência e pelos ensinamentos diários.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, professores, colegas e funcionários, pela oportunidade e pelo imenso conhecimento adquirido.

Agradeço à FAPEMIG pela bolsa de mestrado e aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições.

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1	Erros Inatos do Metabolismo.....	20
1.1.1	<i>Definição</i>	20
1.1.2	<i>Classificação</i>	20
1.2	Doença da Urina do Xarope de Bordo (MSUD).....	21
1.2.1	<i>Definição</i>	21
1.2.2	<i>História</i>	22
1.2.3	<i>Epidemiologia</i>	22
1.2.4	<i>Via metabólica</i>	23
1.2.5	<i>Genética</i>	25
1.2.6	<i>Diagnóstico</i>	26
1.2.7	<i>Clínica</i>	27
1.2.8	<i>Fisiopatologia do dano neurológico</i>	28
1.2.9	<i>Tratamento em longo prazo</i>	31
1.2.10	<i>Tratamento da fase aguda</i>	33
1.2.11	<i>Análise de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>	34
1.2.12	<i>Avaliação do crescimento e desenvolvimento</i>	35
1.2.13	<i>Avaliação de consumo alimentar</i>	36
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo geral.....	41
3.2	Objetivos específicos.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Aspectos éticos.....	43
4.2	Desenho do estudo.....	43
4.3	Pacientes.....	43
4.3.1	<i>Critérios de inclusão</i>	43
4.4	Grupo controle.....	44
4.4.1	<i>Critérios de inclusão</i>	45
4.4.2	<i>Critérios de exclusão</i>	45
4.5	História clínica, avaliação do crescimento e desenvolvimento.....	45
4.6	Avaliação do consumo alimentar.....	47
4.7	Análise de aminoácidos.....	47

4.7.1	<i>Coleta e processamento de amostras</i>	48
4.7.2	<i>Dosagem de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</i>	48
4.7.3	<i>Estimativa de influxo cerebral</i>	49
4.8	<i>Análise molecular</i>	49
4.9	<i>Análise estatística</i>	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Caracterização clínica	52
5.1.1	<i>Paciente 1</i>	52
5.1.2	<i>Paciente 2</i>	54
5.1.3	<i>Paciente 3</i>	57
5.1.4	<i>Paciente 4</i>	60
5.1.5	<i>Paciente 5</i>	63
5.1.6	<i>Paciente 6</i>	66
5.1.7	<i>Considerações gerais</i>	69
5.2	Análise de aminoácidos	71
5.2.1	<i>Técnica analítica</i>	71
5.2.2	<i>Intervalos de referência</i>	73
5.2.3	<i>Resultados das dosagens de aminoácidos e influxo cerebral dos pacientes</i>	78
5.2.3.1	<u>Paciente 1</u>	78
5.2.3.2	<u>Paciente 2</u>	80
5.2.3.3	<u>Paciente 3</u>	82
5.2.3.4	<u>Paciente 4</u>	84
5.2.3.5	<u>Paciente 5</u>	86
5.2.4	<i>Interpretação dos resultados das dosagens de aminoácidos e influxo cerebral</i>	88
5.2.5	<i>Análise da ingestão dietética</i>	92
5.3	Caracterização molecular	95
5.3.1	<i>Paciente 1</i>	95
5.3.2	<i>Paciente 2</i>	97
5.3.3	<i>Paciente 3</i>	99
5.3.4	<i>Paciente 4</i>	101
5.3.5	<i>Paciente 5</i>	103
5.3.6	<i>Paciente 6</i>	105
5.3.7	<i>Considerações gerais</i>	108
6	CONCLUSÕES	110

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
ANEXOS	123
Anexo 1	124
Anexo 2.....	125
APÊNDICES.....	126
Apêndice 1	127
Apêndice 2.....	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada	24
Figura 2: Fisiopatologia do dano neurológico na MSUD	29
Figura 3: Reação de derivatização do OPA	37
Figura 4: Distribuição dos indivíduos do grupo controle segundo idade e sexo	44
Figura 5: Paciente 1 – Estatura/idade	53
Figura 6: Paciente 1 – IMC/idade	54
Figura 7: Paciente 2 – Peso/idade	55
Figura 8: Paciente 2 – Estatura/idade	56
Figura 9: Paciente 2 – IMC/idade	56
Figura 10: Paciente 3 – Peso/idade	58
Figura 11: Paciente 3 – Peso/estatura	59
Figura 12: Paciente 3 – Estatura/idade	59
Figura 13: Paciente 3 – IMC/idade	60
Figura 14: Paciente 4 – Peso/idade	61
Figura 15: Paciente 4 – Peso/estatura	62
Figura 16: Paciente 4 – Estatura/idade	62
Figura 17: Paciente 4 – IMC/idade	63
Figura 18: Paciente 5 - Peso por idade	64
Figura 19: Paciente 5 – Peso/estatura	65
Figura 20: Paciente 5 – Estatura/idade	65
Figura 21: Paciente 5 – IMC/idade	66
Figura 22: Paciente 6 – Peso/idade	67

Figura 23: Paciente 6 – Estatura/idade	68
Figura 24: Paciente 6 – IMC/idade	68
Figura 25: Perfil cromatográfico na quantificação dos aminoácidos em solução	71
Figura 26: Perfil cromatográfico na quantificação dos aminoácidos em plasma de indivíduo do grupo controle	72
Figura 27: Detalhe da presença de pico adicional de aloisoleucina no perfil cromatográfico de pacientes com MSUD	72
Figura 28: Resultados das dosagens de aminoácidos no plasma e influxo cerebral de aminoácidos do Paciente 1	78
Figura 29: Resultados das dosagens de aminoácidos no plasma e influxo cerebral de aminoácidos do Paciente 2	80
Figura 30: Resultados das dosagens de aminoácidos no plasma e influxo cerebral de aminoácidos do Paciente 3	82
Figura 31: Resultados das dosagens de aminoácidos no plasma e influxo cerebral de aminoácidos do Paciente 4	84
Figura 32: Resultados das dosagens de aminoácidos no plasma e influxo cerebral de aminoácidos do Paciente 5	86
Figura 33: Resultado das correlações entre as concentrações séricas de leucina e alanina	90
Figura 34: Resultado das correlações entre as concentrações séricas de isoleucina e alanina	90
Figura 35: Resultado das correlações entre as concentrações séricas de leucina + isoleucina e alanina	91
Figura 36: Resultado das correlações entre ingestão e concentração sérica de leucina e isoleucina	92
Figura 37: Resultado das correlações entre ingestão e concentração sérica de valina.	93
Figura 38: cDNA do gene BCKDHB	95

Figura 39: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.595_596delAG no cDNA e na proteína resultante	96
Figura 40: Sequência de aminoácidos da subunidade E1 β	96
Figura 41: Parte da sequência de cDNA do gene DBT	98
Figura 42: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.1193T>C no cDNA e na proteína resultante	98
Figura 43: cDNA do gene BCKDHB	99
Figura 44: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.359T>C no cDNA e na proteína resultante	100
Figura 45: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.1159C>T no cDNA e na proteína resultante	101
Figura 46: Domínios catalíticos da proteína E1 β	101
Figura 47: Parte da sequência de cDNA do gene DBT	102
Figura 48: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.670G>T no cDNA e na proteína resultante	102
Figura 49: Domínios catalíticos da proteína E2	103
Figura 50: Parte da sequência de cDNA do gene DBT	104
Figura 51: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.261delA no cDNA e na proteína resultante	104
Figura 52: Domínios catalíticos da proteína E2	105
Figura 53: Sequência de DNA dos éxon 1 e parte do íntron 1 do gene BCKDHA	105
Figura 54: Sequência de <i>splicing</i> da junção íntron e éxon do gene BCKDHA	106
Figura 55: Predição dos sítios de <i>splicing</i> no gene BCKDHA não mutado	107
Figura 56: Predição dos sítios de <i>splicing</i> no gene BCKDHA com a mutação c.108+6T>C, descrita no Paciente 6	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação genotípica da MSUD	25
Quadro 2: Valor da Constante de Michaelis (K_m) dos aminoácidos neutros em relação ao transportador LAT1.....	30
Quadro 3: Classificação do estado nutricional de crianças e adolescentes por E/I e P/I segundo escores-z	46
Quadro 4: Classificação do estado nutricional de crianças e adolescentes por P/E e IMC/I segundo escores-z	47
Quadro 5: Sequências de referência utilizadas no sequenciamento dos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT.....	50
Quadro 6: Resumo do diagnóstico e evolução clínica dos pacientes com MSUD	70
Quadro 7: Descrições anteriores da mutação c.595_596delAG	97
Quadro 8: Resumo das alterações moleculares encontradas nos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT dos pacientes com MSUD	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Recomendações nutricionais para pacientes com MSUD.....	32
Tabela 2: Teor dos AACR nas proteínas dos diversos grupos alimentares	47
Tabela 3: Intervalos de referência para os aminoácidos séricos (distribuição normal) .	75
Tabela 4: Intervalos de referência para os aminoácidos séricos (distribuição não normal)	76
Tabela 5: Intervalos de referência de influxo cerebral de aminoácidos (distribuição normal)	76
Tabela 6: Intervalos de referência de influxo cerebral de aminoácidos (distribuição não normal)	77
Tabela 7: Recomendações dietéticas e estimativa de ingestão de energia e nutrientes (Paciente 1)	79
Tabela 8: Recomendações dietéticas e estimativa de ingestão de energia e nutrientes (Paciente 2)	81
Tabela 9: Recomendações dietéticas e estimativa de ingestão de energia e nutrientes (Paciente 3)	83
Tabela 10: Recomendações dietéticas e estimativa de ingestão de energia e nutrientes (Paciente 4)	85
Tabela 11: Recomendações dietéticas e estimativa de ingestão de energia e nutrientes (Paciente 5)	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

AACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
A	Adenina
Ala	Alanina
Arg ou R	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BCAA	Do inglês, <i>Branched chain amino acids</i>
BCKAD	Do inglês, <i>Branched chain keto acid dehydrogenase</i>
C	Citosina
cm	Centímetro
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTI	Centro de Terapia Intensiva
del	Deleção
DEPE	Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DP	Desvio padrão
E	Estatura
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
fs	Do inglês, <i>frameshift</i>
G	Guanina
g	Grama
GABA	Ácido gama aminobutírico
Gln	Glutamina
Glu ou E	Glutamato
Gly	Glicina
HC-UFMG	Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Minas Gerais
His	Histidina
HPLC	Do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I	Idade
IPATIMUP	Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

L	Litro
LAT1	Do inglês, <i>Large amino acid transporter type 1</i>
Leu ou L	Leucina
IC	Intervalo de Confiança
Ile	Isoleucina
IQ	Intervalo interquartil
IMC	Índice de Massa Corporal
K	Lisina
Kcal	Quilocalorias
Kg	Quilogramas
Km	Constante de Michaelis
m	Metro
MCT	Transportador de monocarboxilato
Met	Metionina
MG	Minas Gerais
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MSUD	Do inglês, <i>Maple Syrup Urine Disease</i>
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
nmol	Nanomol
OPA	Ortoftaldialdeído
P	Peso
P	Percentil
P	Prolina
PC	Perímetro cefálico
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe ou F	Fenilalanina
QI	Quociente de inteligência
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
Ser ou S	Serina
UFPML	Unidade Funcional Patologia e Medicina Laboratorial
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina

TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCM	Triglicérides de Cadeia Média
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
v	Volume
Val	Valina
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
°C	Graus Celsius

RESUMO

A Doença da Urina do Xarope de Bordo (MSUD, do inglês, *Maple Syrup Urine Disease*) é um erro inato do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada: leucina, isoleucina e valina. A causa é a deficiência do complexo enzimático desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada. A sintomatologia é neurológica e um dos modelos mais bem descritos para explicá-la se baseia na competição dos aminoácidos neutros na passagem pela barreira hematoencefálica, utilizando o transportador de aminoácidos neutros tipo 1 (LAT1, do inglês, *large amino acid transporter type 1*). O aumento das concentrações de leucina no plasma satura o transportador e, conseqüentemente, reduz o influxo de outros aminoácidos no sistema nervoso central, levando ao atraso de desenvolvimento. No Brasil, o diagnóstico da doença é tardio e os pacientes têm pobre controle clínico e laboratorial, resultando em mau prognóstico. O objetivo desse trabalho, portanto, foi avaliar os seis pacientes com MSUD acompanhados no Hospital das Clínicas (HC – UFMG) quanto aos aspectos clínicos e moleculares, bem como caracterizar o impacto do tratamento dietético a partir do estudo do perfil de aminoácidos. A metodologia se baseou no estudo dos prontuários e em avaliações clínicas e nutricionais periódicas. A quantificação de aminoácidos no plasma foi realizada utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, sendo os intervalos de referência obtidos a partir de um grupo controle de 60 crianças saudáveis. O estudo molecular foi realizado por meio do sequenciamento dos genes envolvidos. Todos os pacientes apresentaram a forma clássica da doença, com início precoce dos sintomas, porém cinco tiveram diagnóstico tardio. A idade no momento do diagnóstico se relacionou com a evolução clínica. O estabelecimento de intervalos de referência para aminoácidos séricos e influxo cerebral permitiu a identificação de valores aumentados de AACR, bem como de deficiências de diversos aminoácidos. As altas concentrações séricas de leucina e de isoleucina estão associadas com a deficiência de alanina. As deficiências de serotonina e catecolaminas no sistema nervoso central devem ser tratadas por meio de reposição nutricional dos aminoácidos deficientes. A aplicação de um método de inquérito alimentar mais fidedigno é necessária para adequada estimativa de ingestão de aminoácidos. Em relação à caracterização molecular, observou-se que, além da heterogeneidade de *locus*, houve também grande heterogeneidade alélica nos indivíduos com MSUD em nossa população, tendo sido descritas quatro novas mutações. Não houve correlação aparente entre o genótipo e o fenótipo.

Palavras-chave: Doença da Urina do Xarope de Bordo; Genética Médica; Transportador 1 de Aminoácidos Neutros; Cromatografia Líquida; Dietoterapia.

ABSTRACT

Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is an inborn error of metabolism of branched chain amino acids: leucine, isoleucine and valine. The cause is the deficiency of the enzymatic complex branched chain keto acid dehydrogenase. The symptoms are neurological and one of the best described models to explain them is based on the competition of neutral amino acids for the influx through blood-brain barrier, which use large amino acid transporter type 1 (LAT1). Increases of leucine concentrations in the plasma saturate the transporter and, consequently, the influx of other amino acids on the central nervous system decreases, leading to impaired development. In Brazil, patients are diagnosed late and have poor clinical and laboratorial control, resulting in unfavorable outcomes. The aim of this study was, therefore, to evaluate six patients with MSUD in treatment in the *Hospital das Clínicas* (HC – UFMG), regarding clinical, diagnosis and molecular characteristics, as well as the impact of the treatment through the study of amino acids profile. The methodology was based on the study of medical records and on clinical and nutritional periodical evaluations. The quantification of amino acids in the plasma was conducted by high performance liquid chromatography and the reference values adopted were calculated from a control group of 60 healthy children. The molecular study was based on sequencing of genes involved. All patients presented the classical form of the disease, with early onset of the symptoms, however five had late diagnosis. The age at the moment of the diagnosis correlated with the clinical outcome. The establishment of reference intervals for plasma amino acids and brain influx allowed the identification of increased levels of branched chain amino acids (BCAA), as well as deficiencies of many amino acids. The high plasma concentrations of leucine and isoleucine are associated with alanine deficiency. Deficiencies of serotonin and catecholamines in the central nervous system should be treated by nutritional replacement of deficient amino acids. The application of a more consistent method of dietary survey is required for adequate estimation of amino acids intake. Concerning the molecular characterization it was observed that, besides locus heterogeneity, there was also a great allelic heterogeneity in individuals with MSUD in our population and four new mutations were described. There was no apparent correlation between the genotype and phenotype.

Keywords: Maple Syrup Urine Disease; Medical Genetics; Large Neutral Amino Acid Transporter 1; Liquid Chromatography; Diet therapy.

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

1.1.1 Definição

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) constituem um grupo diversificado de doenças individualmente raras, mas que agrupadas correspondem a 10% das doenças genéticas descritas (JIMENEZ-SANCHEZ, CHILDS E VALLE, 2001). O termo foi cunhado por Archibald Garrod em 1902, com a descrição da alcaptonúria, doença que leva ao escurecimento da urina quando em contato com álcalis ou ar devido à falha no metabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina (GARROD, 1902; SOUZA, 2002). Sua descrição contribuiu para o entendimento do metabolismo como uma confluência de múltiplos sistemas enzimáticos operando em conjunto e que pode apresentar pequenas diferenças entre indivíduos (CEDERBAUM e STEPHEN, 2006).

Desde então foram descritos mais de 500 distúrbios (ARAÚJO, 2004; SANSEVERINO, WAJNER e GIUGLIANI, 2000; SOUZA, 2002) que se enquadram na classificação de EIM. Em todos os casos ocorrem defeitos enzimáticos que acarretam interrupção de vias metabólicas e os sintomas surgem devido à ausência ou redução de síntese de substâncias, acúmulo de substrato ou surgimento de rotas metabólicas alternativas (EL HUSNY e FERNANDES-CALDATO, 2006). A incidência cumulativa é de 1:5.000 nascidos vivos e a forma de herança é, em geral, autossômica recessiva (MARTINS, 2003). Sua relativa raridade e apresentação inespecífica podem contribuir para o atraso ou não realização do diagnóstico, com consequências por vezes irreparáveis para o desenvolvimento da criança (JARDIM e ASTHON-PROLLA, 1996).

1.1.2 Classificação

Os EIM podem ser classificados em três grandes grupos, de acordo com os fenótipos clínicos da doença (SAUDUBRAY e CHARPENTIER, 1995; SAUDUBRAY, SEDEL e WALTER, 2006). As doenças do Grupo 1 são os erros do metabolismo intermediário, cujos sintomas são decorrentes de intoxicação aguda ou crônica. Compõem esse grupo as aminoacidopatias (fenilcetonúria, tirosinemia, MSUD, alcaptonúria, homocistinúria), acidúrias orgânicas (acidemias isovalérica, propiônica, metilmalônica, glutárica), defeitos do ciclo da uréia (deficiência da carbamoil fosfato sintetase, citrulinemia, acidúria arginosuccínica) e as intolerâncias aos açúcares (galactosemia, intolerância hereditária à frutose). Pacientes com

essas doenças podem apresentar sintomas intermitentes, que surgem por intercorrências médicas, como infecções agudas, ou por ingestão aumentada dos alimentos restritos em cada caso. O tratamento é frequentemente nutricional, por meio da restrição da substância nociva da dieta (MARTINS, 2003).

As doenças do Grupo 2 resultam de deficiência na produção ou utilização de energia, devido a distúrbios do fígado, miocárdio, músculo ou cérebro. Encontram-se nesse grupo as doenças de depósito de glicogênio (formas hepáticas e musculares), doenças mitocondriais e hiperlactemias congênitas (defeitos de fosforilação oxidativa, deficiência do complexo da piruvato desidrogenase) e defeitos da oxidação de ácidos graxos (deficiências de acil-CoA desidrogenase, deficiência de transporte plasmático da carnitina). Nesse grupo, o tratamento nutricional é preconizado de acordo com o tipo de doença como, por exemplo, alimentação frequente, com restrição de açúcares de absorção rápida e prescrição de amido de milho cru para prevenção da hipoglicemia na glicogenose tipo 1 (CHEN, CORNBLATH e SIDBURY, 1984). A suplementação de cofatores (L-carnitina, tiamina) pode também ser utilizada em doenças específicas (MARTINS, 2003).

O Grupo 3 é constituído por distúrbios de síntese ou catabolismo de macromoléculas. Os sinais e sintomas são permanentes e progressivos e não dependem de estímulos ambientais. Citam-se as doenças de depósito lisossômico (mucopolissacaridoses, esfingolipidoses, glicoproteinoses, distúrbios do transporte de membrana) e as doenças peroxissomiais (síndrome de Zellweger, adrenoleucodistrofia, doença de Refsum). A doença pode se manifestar ao nascimento ou nos primeiros anos de vida e o tratamento se baseia no suporte clínico, embora exista terapia de reposição enzimática e a possibilidade de transplante de medula para algumas doenças lisossomais e peroxissomiais (MARTINS, 2003).

1.2 Doença da Urina do Xarope de Bordo (MSUD)

1.2.1 Definição

A Doença da Urina do Xarope de Bordo (MSUD, do inglês, *Maple Syrup Urine Disease*; MIM 248600) tem diversas sinónimas, como Leucinose e cetoacidúria de cadeia ramificada. É um erro inato do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR): leucina, isoleucina e valina. A causa é a deficiência do complexo enzimático desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (BCKAD, do inglês, *branched chain keto acid*

dehydrogenase). Os sintomas são neurológicos, com crises agudas de início geralmente nos primeiros dias de vida e deterioração crônica decorrente de acúmulo de AACR e seus cetoácidos. Esses compostos são responsáveis também pelo odor característico de xarope de bordo na urina (CHUANG e SHIH, 2001).

1.2.2 História

A doença foi descrita por John Menkes e colaboradores, no ano de 1954, em Boston, Estados Unidos. A identificação foi feita a partir de uma família com quatro filhos, sendo dois deles falecidos com cerca de três meses de idade, após deterioração do quadro neurológico com início na primeira semana de vida. A quarta criança foi atendida com sintomas neurológicos degenerativos, convulsões e edema cerebral e, assim como as crianças falecidas, apresentava odor adocicado característico na urina, comparado ao cheiro do xarope de bordo (MENKES, HURTT e CRAIG, 1954).

A análise de amostras de urina desse paciente revelou altas concentrações de cetoácidos de cadeia ramificada o que levou Menkes a sugerir que a doença decorria de um defeito na via dos AACR, confirmado pela identificação de altas concentrações séricas desses aminoácidos em estudo de Westall e colaboradores, em 1957. Menkes postulou, ainda, que esses aminoácidos deveriam compartilhar a mesma via de degradação, uma vez que foi observado o aumento concomitante dos três cetoácidos (MENKES, 1959). A deficiência do complexo BCKAD nos pacientes foi confirmada em 1960, a partir de estudo de atividade em leucócitos (DANCIS, HUTZLER e LEVITZ, 1960). A restrição rigorosa de AACR na dieta foi proposta como forma de tratamento em 1964 (SNYDERMAN, 1964).

1.2.3 Epidemiologia

A incidência mundial de MSUD é de 1:185.000 nascidos vivos, baseada em um estudo de triagem neonatal com 26,8 milhões de crianças em todo o mundo (CHUANG e SHIH, 2001). A incidência entre os países, porém, é bastante heterogênea, sendo que valores maiores foram descritos, por exemplo, na Espanha (1:12.000 a 1:50.000) (FRAGA e ALONSO-HERNANDEZ, 1987) e em Portugal (1:86.800) (QUENTAL et al., 2010). A maior frequência observada é de 1:176 nascidos vivos, na população menonita do leste da

Pensilvânia, nos Estado Unidos, que é historicamente atribuída a efeito fundador e à prática endogâmica (DIGEORGE et al., 1982). Essa hipótese foi confirmada por Love-Gregory e colaboradores em 2002, por análise dos haplótipos utilizando marcadores microssatélites.

1.2.4 Via metabólica

Os AACR são aminoácidos essenciais, neutros, alifáticos, com uma ramificação metil na cadeia lateral. Seus esqueletos carbonados são incorporados nas proteínas ou direcionados para degradação oxidativa na mitocôndria. São metabolizados no músculo esquelético como fonte alternativa de energia ou oxidados no fígado, rins, coração e tecido adiposo. A via de oxidação dos AACR tem três etapas em comum: transaminação, descarboxilação oxidativa e desidrogenação, sendo a segunda etapa deficiente em pacientes com MSUD (CHUANG e SHIH, 2001) (Fig. 1).

A transaminação dos AACR é reversível e catalisada por uma aminotransferase presente tanto no citosol quanto na mitocôndria das células (HALL, 1993). Leucina, isoleucina e valina são convertidas, assim, em seus cetoácidos correspondentes, α -cetoisocapróico, α -ceto- β -metilisovalerato e α -cetoisovalerato, usando α -cetoglutarato como receptor do grupo amina (TAYLOR E JENKINS, 1966). A atividade da aminotransferase de AACR é alta no coração, rins, diafragma, pâncreas, estômago e glândulas mamárias em lactação, intermediária no músculo esquelético e baixa no fígado (CAPPUCCINO, KADOWAKI e KNOX, 1978; ICHIHARA, NODA E OGAWA 1973; ICHIHARA, 1975).

O transporte para o interior da mitocôndria é possível tanto na forma de AACR quanto de seus cetoácidos, usando transportadores específicos (HUTSON e RANNELS, 1985; LANOUE e SCHOOLWERTH, 1979). Na membrana interna da mitocôndria a enzima BCKAD catalisa a descarboxilação oxidativa dos cetoácidos, em uma reação irreversível (HARPER, MILLER e BLOCK, 1984). A enzima é abundante no fígado, tem concentração intermediária nos rins e coração e baixa no músculo esquelético, tecido adiposo e cérebro. Supõe-se, entretanto, que o músculo esquelético seja o maior sítio de descarboxilação, uma vez que corresponde a 40% da massa corporal total (BUSE et al., 1972; GOLDBERG e CHANG, 1978).

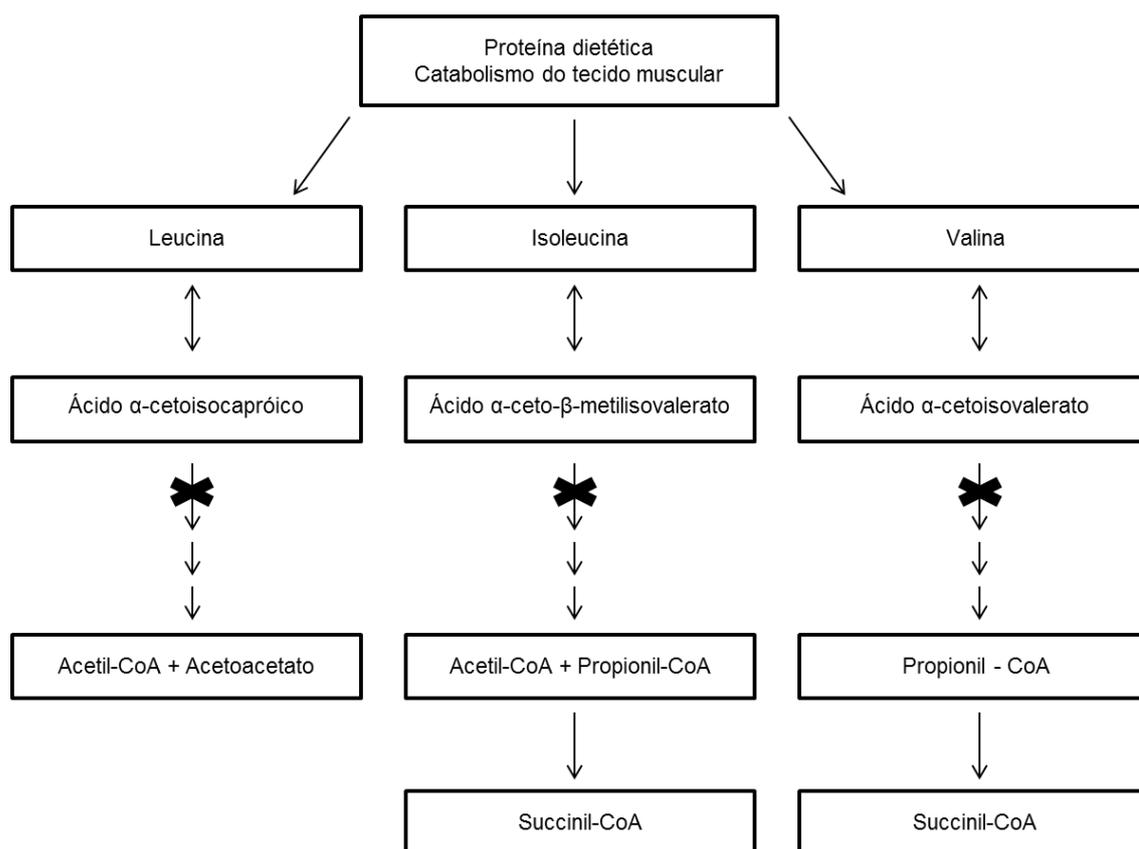


Figura 1: Via catabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada. As setas interrompidas representam o bloqueio enzimático presente na MSUD. Essa interrupção causa acúmulo dos AACR e seus cetoácidos no organismo.

Fonte: Adaptado de ACOSTA e YANNICELLI, 2001

O complexo enzimático BCKAD é formado por três diferentes subunidades catalíticas, sendo um núcleo formado por 24 subunidades de diidrolipoil transacilase (E2) ao qual estão ligadas várias cópias da descarboxilase de cetoácidos de cadeia ramificada (E1) e diidrolipoil desidrogenase (E3), além das enzimas regulatórias cinase e fosfatase. E1 é um tetrâmero formado por duas cópias de E1 α e duas cópias de E1 β (PETTI, YEAMAN e REED, 1978; REED, DAMUNI e MERRYFIELD, 1985). O componente E1 catalisa a descarboxilação mediada por tiamina pirofosfato e subsequente redução da fração lipoil, ligada de forma covalente à E2. O lipoil reduzido atua na transferência do grupo acil de E1 para CoA, gerando acil-CoA. O componente E3, que possui um FAD ligado, oxida o resíduo diidrolipoil de E2, usando NAD⁺ comoceptor de elétrons (OLIVER e REED, 1982). Pelos produtos finais de sua oxidação a leucina é classificada como aminoácido cetogênico, valina como glicogênico e isoleucina como aminoácido cetogênico e glicogênico (CHUANG, CHUANG e WYNN, 2006).

1.2.5 Genética

As subunidades E1 α , E1 β , E2 e E3 da enzima BCKAD são codificadas por quatro genes diferentes e mutações em qualquer um deles resultam em doença. A forma de herança é autossômica recessiva e monogênica, ou seja, os indivíduos afetados são sempre homocigotos ou heterocigotos compostos para mutações em um mesmo *locus* (CHUANG e SHIH, 2001). Para efeito de classificação, a doença pode ser subdividida em tipos, de acordo com o gene mutado e com a subunidade da enzima afetada, como apresentado no quadro 1.

Quadro 1 – Classificação genotípica da MSUD (MIM 248600)

Tipo	Gene	Localização	Subunidade
IA	BCKDHA	19q13.2	E1 α
IB	BCKDHB	6q14.1	E1 β
II	DBT	1p21.2	E2
III	DLD	7q31.1	E3

Nellis e colaboradores (2003) relataram baixa correlação genótipo-fenótipo concluindo que não há impacto relevante do *locus* mutado na evolução clínica do paciente. Outros estudos, no entanto, relatam correlações, por exemplo, entre mutações no gene DBT e a existência de um fenótipo possivelmente responsivo ao tratamento com tiamina (CHUANG et al., 2004; QUENTAL et al., 2008).

A subunidade E3 é comum aos complexos piruvato e α -cetoglutarato desidrogenase e sua deficiência, portanto, gera fenótipo clínico diverso e mais grave, com poucos casos descritos na literatura (MATUDA et al., 1984; ROBINSON et al., 1981). Quando é identificado o fenótipo clássico de MSUD a pesquisa molecular se baseia no sequenciamento completo dos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT, que possuem entre 9 e 11 éxons e codificam proteínas com 445, 392 e 482 resíduos, respectivamente.

Há um grande número de mutações descritas para os três genes. A base de dados HGMD (*The Human Gene Mutation Database*), do Instituto de Genética Médica de Cardiff registra 66 mutações para o gene BCKDHA, 66 para o gene BCKDHB e 54 para o gene DBT, entre mutações sem sentido, de sentido trocado, de sequência consenso de *splicing*, pequenas deleções e inserções, *indels*, grandes deleções e rearranjos complexos, todas levando ao fenótipo de MSUD (CARDIFF UNIVERSITY, 2011).

1.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico precoce é o mais forte determinante do sucesso no tratamento de pacientes com MSUD (CHUANG e SHIH, 2001). Poucos pacientes diagnosticados após os 14 dias de vida apresentam desenvolvimento normal e os melhores resultados têm sido observados quando o tratamento é iniciado antes dos 10 dias (KAPLAN et al., 1991; NORD, VAN DOORNINCK e GREENE, 1991; SNYDERMAN, 1988). Essa observação motivou a inclusão da enfermidade nos testes de triagem neonatal em dezenas de países. No Brasil, entretanto, a detecção precoce da doença ainda não é uma realidade já que a MSUD não está incluída nos exames de triagem neonatal disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Desde 1995 a técnica utilizada para triagem neonatal de MSUD é a espectrometria de massa em tandem a partir de sangue coletado em papel filtro, em substituição ao ensaio de inibição do crescimento bacteriano anteriormente utilizado (CHACE et al., 1995). O sangue é coletado entre 24 e 48 horas de vida, quando já pode ser observada elevação sérica da concentração de leucina e isoleucina em comparação aos demais aminoácidos em crianças afetadas (STRAUSS, PUFFENBERGER e MORTON, 2006). A triagem neonatal tem mostrado efeitos positivos na redução do acometimento neurológico em crianças com a doença (SIMON et al., 2006), embora existam algumas evidências de que a técnica falhe em identificar pacientes com formas variantes de MSUD (PUCKET et al., 2010).

Crianças com sintomas clínicos da doença ou teste de triagem neonatal alterado, quando disponível, devem ter o diagnóstico confirmado através da dosagem quantitativa de aminoácidos séricos. Em pacientes com MSUD é observado, principalmente, o aumento da concentração de leucina em relação a outros aminoácidos, como alanina, glutamato, triptofano, metionina, histidina, fenilalanina e tirosina, sendo que isoleucina e valina podem estar em concentrações normais (STRAUSS, PUFFENBERGER e MORTON, 2006). A quantificação de cetoácidos na urina pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa é também recomendada (LANCASTER et al., 1973). Esses cetoácidos podem, também, ser facilmente identificados pelo teste da dinitrofenilhidrazina (DNPH), útil como ferramenta de baixo custo para triagem e acompanhamento clínico dos pacientes, que se apresenta turvo quando os cetoácidos urinários encontram-se elevados (STRAUSS, PUFFENBERGER e MORTON, 2006). A presença de aloisoleucina, um metabólito derivado da racemização da isoleucina, é patognomônica para a doença (NORTON et al., 1962; SCHADEWALDT et al., 1999), porém esse exame não é comumente realizado no Brasil.

O fenótipo metabólico pode ser definido a partir da dosagem de atividade enzimática residual em fibroblastos (CHUANG e COX, 1988) e linfoblastos (JINNO, AKABOSHI e MATSUDA, 1984). Este teste, entretanto, assim como o sequenciamento dos genes para definição das alterações moleculares, não é imperativo para diagnóstico e seguimento clínico dos pacientes.

1.2.7 Clínica

A sintomatologia observada na MSUD é causada pelo acúmulo da leucina e seu cetoácido α -cetoisocapróico no plasma e órgãos e esse composto é também responsável pelo odor característico na urina e cerume de pacientes não tratados. Pouca toxicidade é atribuída a concentrações elevadas de isoleucina ou valina (CHUANG e SHIH, 2001; KOREIN et al., 1994). Os episódios mais graves de intoxicação são desencadeados por catabolismo proteico, seja por jejum ou estresse fisiológico em recém-nascidos e por infecções, exercício físico, injúrias ou cirurgias em crianças (BERRY et al., 1991; THOMPSON, FRANCIS e HALLIDAY, 1991). Nestes episódios de descompensação metabólica podem ser observados fadiga muscular, dor epigástrica, vômito e disfunção neurológica aguda manifestada por redução da cognição, hiperatividade, anorexia, distúrbios do sono, alucinações, distonia e ataxia (MORTON et al., 2002).

O quadro neurológico é acompanhado de edema cerebral cuja fisiopatologia se inicia pela desidratação hipernatrêmica desencadeada por acúmulo de AACR, seus cetoácidos, corpos cetônicos e ácidos graxos livres no compartimento extracelular e conseqüente prejuízo aos sistemas de controle de volume celular (STRAUSS e MORTON, 2003). Nessa situação o tecido cerebral tende a acumular íons e outros solutos e a arginina vasopressina é simultaneamente liberada (HERTZ, CHEN e SPATZ, 2000; SARFARAZ e FRASER, 1999), causando acúmulo de água corporal total (GUYTON e HALL, 1996) e aumento da permeabilidade do cérebro (DEPASQUALE, PATLAK e CSERR, 1989), que ocorre de forma ainda mais abrupta quando a terapia de correção da desidratação é instituída (KROLL, JUHLER e LINDHOLM, 1992). O quadro de edema cerebral pode levar ao óbito por herniação cerebral, principalmente em crianças com idade de 4 a 15 anos, que são minimamente tolerantes ao aumento do volume cerebral (STRAUSS e MORTON, 2003).

A classificação de MSUD pode ser feita em subtipos de acordo com a apresentação clínica da doença, sendo que cerca de 80% dos pacientes possuem a forma clássica (BEN-OMRAN et al., 2006; HENNEKE et al., 2003; SCHOMBERGER et al., 2004; SIMON et al.,

2006). Nesse caso o início dos sintomas é no período neonatal e se caracteriza por sucção débil, letargia, hipotonia ou hipertonia, opistótono (CABRAL et al., 1998), movimentos de esgrima ou de pedalar (STRAUSS et al., 2006), cetoacidose, convulsões e óbito nos primeiros meses de vida se a criança não for diagnosticada e tratada (CHUANG e SHIH, 2001). A atividade enzimática é frequentemente inferior a 2% do normal (HENNEKE et al., 2003). Na forma intermediária não é observada catástrofe neurológica nos primeiros dias de vida, sendo o diagnóstico mais comumente feito durante a infância devido a atraso no crescimento e desenvolvimento, convulsões (FISCHER e GERRITSEN, 1971) e cetoacidose persistente (MULLER, 1971). Nesses casos, a atividade enzimática está entre 3 e 30% (MITSUBUCHI, OWADA e ENDO, 2005). A forma intermitente é caracterizada por crises de descompensação desencadeadas por situações de estresse metabólico, com normalização do quadro fora desses episódios e desenvolvimento normal. A atividade enzimática se encontra entre 5 e 20% (CHUANG et al., 1995). MSUD responsiva à tiamina tem apresentação semelhante às formas intermediária e intermitente, mas a administração de altas doses de tiamina, cofator da enzima, pode melhorar o quadro clínico (CHUANG et al., 2004). Não existem relatos de pacientes tratados exclusivamente com a suplementação, o que coloca em dúvida a real existência dessa forma da doença (STRAUSS et al., 2006).

1.2.8 Fisiopatologia do dano neurológico

O acometimento neurológico é um achado frequente em pacientes com MSUD, seja na sua forma aguda ou crônica, sendo esta última manifestada por atraso no crescimento e desenvolvimento, anemia, rompimento de barreiras mucosas, imunodeficiência e defeitos na mielinização. Déficits de atenção, impulsividade, depressão, pânico e hiperatividade são também observados com relativa frequência, sendo por vezes necessária a introdução de medicamentos psicoativos (STRAUSS et al., 2006). O quociente de inteligência (QI) de pacientes com MSUD é influenciado, principalmente, por idade do diagnóstico, condição neonatal e controle metabólico em longo prazo (NORD, VAN DOORNINCK e GREENE, 1991), sendo que pacientes com diagnóstico precoce, ou seja, nos primeiros dias de vida, têm QI normal (KAPLAN et al., 1991).

Diversos são os mecanismos propostos indicando que o quadro neurológico observado nesses pacientes tem caráter multifatorial. Um dos modelos mais bem descritos se baseia na competição dos aminoácidos neutros na passagem pela barreira hematoencefálica tradicionalmente utilizado como controle de tratamento da fenilcetonúria

(MATALON et al., 2006) e também aplicado a pacientes com MSUD por Strauss e colaboradores em 2010 (Fig. 2B e 2C).

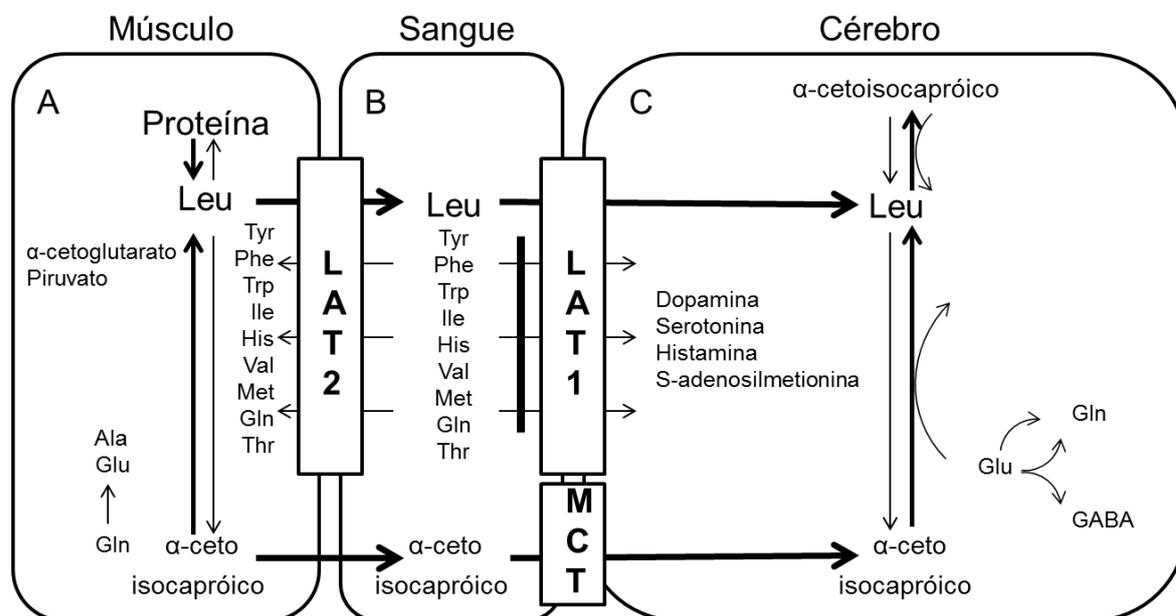


Figura 2: Fisiopatologia do dano neurológico na MSUD. A) Aminoácidos são liberados pela degradação de proteína muscular. O acúmulo de ácido α -cetoisocapróico em pacientes com MSUD estimula a transaminação reversa com consumo principalmente de glutamina, glutamato e alanina. A leucina é transportada para o sangue através do sistema LAT2 e leva ao influxo compensatório dos demais aminoácidos neutros. B) A redução da concentração sérica dos demais aminoácidos é agravada pelo bloqueio do transportador LAT1 pelas altas concentrações de leucina, representado na figura pela barra sólida. O ácido α -cetoisocapróico é transportado por um transportador de monocarboxilato (MCT). C) A redução do influxo dos aminoácidos neutros leva a menor produção de neurotransmissores no sistema nervoso central. A transaminação reversa, assim como no músculo, reduz as concentrações de glutamato, glutamina e GABA.

Fonte: Adaptado de STRAUSS et al., 2010

O papel dos aminoácidos no desenvolvimento e funcionamento cerebral é detalhadamente descrito e sabe-se que as diferenças estruturais entre eles influenciam sua ação no sistema nervoso central. Os aminoácidos neutros do plasma são transportados através da barreira hematoencefálica pelo sistema LAT1 (do inglês, *large amino acid transporter type 1*), independente de sódio e energia, bi-direcional e saturável em condições fisiológicas. Dez aminoácidos utilizam esse mesmo transportador, com afinidades diferentes, a saber, em ordem decrescente: fenilalanina, triptofano, leucina, metionina, isoleucina,

tirosina, histidina, valina, treonina e glutamina. Por esse motivo o sistema LAT1 é sensível à competição entre aminoácidos e qualquer alteração que promova o aumento plasmático de um deles irá refletir em menor influxo dos competidores. A constante de Michaelis (K_m) representa a concentração que promove meia saturação do transportador para cada aminoácido, na situação hipotética de ausência dos competidores, sendo fortemente influenciada pela hidrofobia da cadeia lateral dos aminoácidos e sua conformação. O K_m de cada aminoácido neutro em relação ao transportador LAT1 foi medido em experimento conduzido por Smith e colaboradores em 1987 e os valores encontram-se descritos no quadro 2.

Quadro 2 – Valor da Constante de Michaelis (K_m) dos aminoácidos neutros em relação ao transportador LAT1

Aminoácido	K_m (nmol/mL)	Aminoácido	K_m (nmol/mL)
Fenilalanina	11	Tirosina	64
Triptofano	15	Histidina	100
Leucina	29	Valina	210
Metionina	40	Treonina	220
Isoleucina	56	Glutamina	880

Fonte: SMITH et al., 1987

A afinidade dos aminoácidos pelo transportador é medida por $1/K_m$. Como a leucina tem um baixo K_m sua afinidade pelo transportador LAT1 é alta. Conseqüentemente, quando seus níveis encontram-se aumentados no sangue, como comumente ocorre em pacientes com MSUD, a leucina satura o transportador, prejudicando o influxo dos demais aminoácidos e afetando, assim, a regulação do volume celular no tecido. Strauss e colaboradores (2010) estimaram o aporte dos aminoácidos pela barreira hematoencefálica em pacientes menonitas da Pensilvânia, utilizando os valores de aminoácidos séricos e equação descrita para esse fim (SMITH e STOLL, 1998). Observaram que muitos pacientes com MSUD apresentaram baixo aporte crônico de diversos aminoácidos no sistema nervoso central o que poderia ser causa do atraso de desenvolvimento (STRAUSS et al., 2010). Isso ocorre porque, além de todos os aminoácidos serem necessários ao adequado crescimento e metabolismo do sistema nervoso central, alguns deles são ainda precursores de neurotransmissores, como o triptofano para a serotonina, e a tirosina para as catecolaminas (SMITH e STOLL, 1998). Nessa população, foi introduzida nova fórmula metabólica de tratamento com suplementação de aminoácidos adequada às deficiências observadas, com melhora do controle metabólico e do padrão de influxo de aminoácidos neutros no sistema nervoso central (STRAUSS et al., 2010).

O desequilíbrio de aminoácidos é agravado pelo mecanismo de transaminação reversa que ocorre tanto no músculo quanto no sistema nervoso central, desencadeado pela presença de altas concentrações de ácido α -cetoisocapróico. Essa situação atua como estímulo à conversão do cetoácido em leucina, com consumo de glutamato e redução da concentração de glutamina, aspartato, alanina e outros aminoácidos. No músculo isso promove influxo desses aminoácidos e acentuação de sua redução sérica (Fig. 2A) (STRAUSS et al., 2010). Segundo Yudkoff e colaboradores (2005) a depleção desses aminoácidos no sistema nervoso central resulta em falha no metabolismo energético devido à interrupção do sistema malato-aspartato e diminuição da síntese proteica no tecido nervoso.

A deficiência isolada de um aminoácido também pode ter efeitos graves no crescimento e desenvolvimento infantis. Strauss e colaboradores (2010) relataram o caso de um paciente atendido com cinco meses de idade apresentando deficiência crônica de valina, crescimento cerebral estagnado e hipomielinização. Foi introduzida suplementação agressiva de valina, de modo a manter seus níveis séricos duas vezes maiores que os de leucina. Com isso, foi observada aceleração do crescimento da circunferência cefálica e da mielinização cerebral. Os autores concluíram que a deficiência de valina apresenta-se como importante causa de microcefalia em pacientes com MSUD (MORTON et al., 2002).

1.2.9 Tratamento em longo prazo

O tratamento da MSUD é preponderantemente dietético, através da instituição de dieta restrita em AACR por toda a vida, com os objetivos de manter adequados os níveis séricos desses aminoácidos, promover crescimento normal e prevenir o catabolismo proteico, além de minimizar o dano cerebral (CHUANG e SHIH, 2001; PRASAD, DALTON e LEVY, 1998; SCHONBERGER et al., 2004). O acompanhamento dos pacientes precisa ser rigoroso e a dosagem sérica de aminoácidos deve ser realizada semanalmente em crianças menores de um ano, quinzenalmente até os três anos de idade e mensalmente após esse período. Essa dosagem deve ser mais frequente na vigência de descompensação metabólica (SOCIEDADE PORTUGUESA DE DOENÇAS METABÓLICAS, 2007). Recomenda-se que os níveis séricos sejam mantidos entre 150 – 300 nmol/mL para leucina e entre 200 – 400 nmol/mL para isoleucina e valina (STRAUSS e MORTON, 2003).

Para tanto, a dieta de pacientes com MSUD deve ser restrita em alimentos altamente proteicos, como carnes, ovos, leguminosas, leites e derivados e suplementada com fórmula

metabólica especial isenta de AACR para que sejam supridas as necessidades proteicas e energéticas da criança. Por serem aminoácidos essenciais, os AACR devem estar presentes em quantidades mínimas na dieta, que variam conforme a faixa etária do paciente. Esse aporte é garantido pelo fornecimento de quantidades controladas de fórmula infantil e alimentos vegetais com baixo teor proteico. As recomendações estabelecidas para proteínas, AACR, energia e líquidos para pacientes com MSUD estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Recomendações nutricionais para pacientes com MSUD

	Leucina	Isoleucina (mg/Kg)	Valina	Proteína (g/Kg)	Energia (Kcal/Kg)	Líquidos (mL/Kg)
Bebês						
0 < 3 meses	60-100	36-60	42-70	3,5-3,0	120 (145-95)	150-125
3 < 6 meses	50-85	30-50	35-60	3,5-3,0	115 (145-95)	160-130
6 < 9 meses	40-70	25-40	28-50	3,0-2,5	110 (135-80)	145-125
9 < 12 meses	30-55	18-33	21-38	3,0-2,5	105 (153-80)	135-120
Crianças						
		(mg/dia)		(g/dia)	(Kcal/dia)	(mL/dia)
1 < 4 anos	275-535	165-325	190-375	≥ 30	1300 (900-1800)	900-1800
4 < 7 anos	360-695	215-420	250-490	≥ 35	1700 (1300-2300)	1300-2300
7 < 11 anos	410-785	245-470	258-550	≥ 40	2400 (1650-3300)	1650-3300
Mulheres						
11 < 15 anos	550-740	330-445	385-520	≥ 50	2200 (1500-3000)	1500-3000
15 < 19 anos	550-740	330-445	385-520	≥ 50	2100 (1200-3000)	1200-3000
≥ 19 anos	400-620	300-450	420-650	≥ 50	2100 (1400-2500)	1400-2500
Homens						
11 < 15 anos	540-720	325-435	375-505	≥ 55	2700 (2000-3700)	2000-3700
15 < 19 anos	705-945	425-570	495-665	≥ 65	2800 (2100-3900)	2100-3900
≥ 19 anos	800-1000	575-700	560-800	≥ 65	2900 (2000-3300)	2000-3300

Fonte: ACOSTA e YANNICELLI, 2001

A tolerância à leucina é definida como a quantidade diária ingerida que esteja associada a um estado de crescimento normal e níveis séricos estáveis, variando com a idade, crescimento, estado nutricional e de saúde do paciente (STRAUSS et al., 2006). Tipicamente estes valores se encontram entre 40 – 80mg/Kg em bebês, decrescendo para 20 – 40mg/Kg para crianças e 5 – 15mg/Kg em adultos. Uma vez que a degradação enzimática da leucina nesses pacientes é praticamente nula, sua tolerância reflete os níveis de perda insensível somados à deposição de proteína corporal (SCHADEWALDT e WENDEL, 1997). A suplementação de isoleucina (20 – 50 mg/Kg/dia para recém-nascidos e 5 – 15 mg/Kg/dia para crianças) e de valina (30 – 60 mg/Kg/dia para recém-nascidos e 10 – 30 mg/Kg/dia para crianças) pode se tornar necessária devido ao declínio acentuado da concentração sérica desses aminoácidos durante o tratamento (RODRIGUES, 2002). Perda de peso, vermelhidão da mucosa bucal, fissuras nos cantos da boca, descamação da pele,

redução do colesterol plasmático e irritabilidade são sinais clínicos da deficiência desses aminoácidos (STRAUSS e MORTON, 2003).

O transplante hepático tem sido preconizado no tratamento de pacientes com MSUD, sendo capaz de normalizar os níveis plasmáticos de AACR, aumentando a tolerância à leucina em mais de dez vezes. A taxa de sobrevivência tem sido próxima a 100% e foi observada estabilização, mas não reversão, do dano cerebral (MAZARIEGOS et al., 2011).

1.2.10 Tratamento da fase aguda

A descompensação metabólica em pacientes com MSUD deve ser evitada através da instituição de uma dieta específica durante a vigência de infecções, vacinação, traumas e qualquer outra situação que possa favorecer o catabolismo proteico. Essa dieta deve ser isenta de leucina, suplementada com isoleucina, valina e energia, o que pode ser atingido eliminando a proteína natural da dieta e aumentando a concentração de fórmula metabólica, lipídios e, ocasionalmente, polímeros de glicose (STRAUSS et al., 2010).

Se já instituída, a crise de descompensação metabólica deve ser tratada em ambiente hospitalar, com medidas que visem à redução da concentração de leucina sérica, por meio da promoção do anabolismo. O jejum deve ser evitado, podendo ser iniciada terapia nutricional enteral ou parenteral. A dieta deve fornecer 150 – 200% da recomendação de energia para a faixa etária, sendo 50% da energia não proteica na forma de lipídios e 50% carboidratos, 2,5 – 3 g/Kg/dia de fórmula metabólica isenta de AACR e 20 – 120 mg/Kg/dia de isoleucina e valina. A administração de insulina, manitol, furosema e solução salina hipertônica pode ser recomendada para controle do edema cerebral. A monitorização dos aminoácidos séricos deve ser realizada no intervalo de 1 a 3 dias durante a fase aguda (STRAUSS e MORTON, 2003; STRAUSS et al., 2010). As técnicas de depuração exógena da leucina têm sido citadas como maneira eficiente de controle metabólico (SOCIEDADE PORTUGUESA DE DOENÇAS METABÓLICAS, 2007), entretanto existem evidências de que a depuração endógena por meio da promoção do anabolismo apresenta melhores resultados quando comparada às técnicas invasivas de diálise e hemofiltração (MORTON et al., 2002).

1.2.11 Análise de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), é considerada uma das mais poderosas ferramentas da química analítica, capaz de separar, identificar e quantificar os componentes de qualquer amostra solúvel na fase móvel (WELEY, 2004). Nesse método a fase estacionária pode ser constituída de um sólido ou líquido sobre a qual eluirá a fase móvel, separando os solutos de acordo com a afinidade. A HPLC utiliza colunas metálicas fechadas com partículas muito finas e bombas de alta pressão, o que reduz substancialmente o tempo de análise, com bons resultados quantitativos, facilitando a utilização da técnica na prática clínica (HARRIS, 2005).

A leitura é realizada por meio de acoplamento do aparelho com detector de fluorescência ou de ultravioleta. O procedimento de HPLC é aplicável na quantificação de ampla gama de substâncias, como pesticidas, cosméticos, fármacos, vitaminas proteínas e aminoácidos (SKOOG, JAMES e STANLEY, 2002).

A quantificação de aminoácidos séricos é de grande importância na identificação e controle de diversas desordens metabólicas (ZOPPA et al., 2006), sendo essa determinação comumente realizada utilizando-se HPLC de fase reversa, ou seja, fase móvel de polaridade moderada e fase estacionária apolar, com derivatização pré-coluna (REVERTER, LUNDH e LINDBERG, 1997). A derivatização consiste na sinalização do composto de interesse com um grupo químico necessário à sua detecção pela técnica utilizada, por exemplo, um composto fluorescente. Sua função, assim, é aumentar a seletividade e sensibilidade da análise, principalmente em amostras biológicas complexas (WHITE, 1984).

Diversos derivatizantes podem ser utilizados na determinação de aminoácidos como, por exemplo, o ortoftaldialdeído (OPA). A reação de derivatização por OPA consiste na ligação desse composto, que em si não é fluorescente, com aminas primárias, que ocorre rapidamente à temperatura ambiente, formando substâncias fluorescentes. A reação com o OPA é, no entanto, bastante instável e esses compostos serão rapidamente convertidos a produtos de degradação não fluorescentes (LINDROTH, HAMBERGER e SANDBERG, 1986) (Fig. 3).

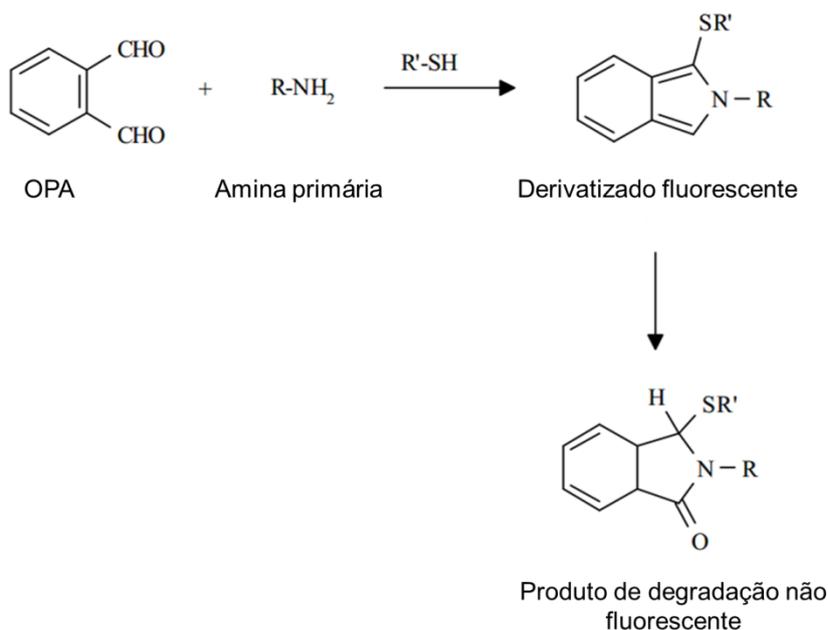


Figura 3: Reação de derivatização do OPA com aminas primárias. O derivatizado fluorescente resultante da ligação de OPA com aminas primárias será quantificado com a utilização de detector de fluorescência acoplado ao HPLC.

Fonte: Adaptado de SIMONS e JOHNSON, 1976.

A instabilidade do produto fluorescente e a capacidade do OPA de apenas reagir com aminoácidos primários são compensados pelo fato de que sua utilização permite uma análise de alta sensibilidade e reprodutibilidade (MOLNÁR-PERL, 2011), a relativo baixo custo, tornando-o o derivatizante mais amplamente utilizado na análise de aminoácidos (LINDROTH, HAMBERGER e SANDBERG, 1986; LIU, 2001).

1.2.12 Avaliação do crescimento e desenvolvimento

A avaliação periódica do crescimento e desenvolvimento é parte essencial do controle do tratamento de crianças com MSUD, devendo ser realizada em conjunto, de forma sistemática e programada. Ao avaliar o desenvolvimento de crianças, quatro grandes campos devem ser observados: desenvolvimento motor, adaptativo, da linguagem e pessoal-social. A literatura descreve os principais marcos de desenvolvimento segundo faixas etárias, permitindo o estabelecimento de referências de normalidade e a identificação das inadequações (CARVALHO et al., 2013).

Para avaliação do crescimento a antropometria é uma ferramenta útil, não invasiva e de baixo custo (HEYWARD, 2001; PETROSKI, 2003). Na faixa etária pediátrica as medidas mais amplamente utilizadas são o peso e a estatura ou comprimento, sendo estas combinadas em índices que, analisados de acordo com padrões internacionais de referência, permitem a determinação da adequação do crescimento infantil (VASCONCELOS, 2007).

As curvas de crescimento da Organização Mundial de Saúde (OMS) são consideradas como padrão de referência a ser utilizado na avaliação do crescimento de crianças e adolescentes e foram desenvolvidas por meio de um estudo multicêntrico, longitudinal, incluindo crianças de vários países com diferentes níveis de desenvolvimento (DE ONIS et al., 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a, 2006b, 2006c). As medidas preconizadas na avaliação são peso (P), Estatura (E) e Índice de Massa Corporal (IMC), plotados de acordo com a idade (I) sendo que os índices utilizados na análise da adequação do crescimento variam com a faixa etária. Para crianças de 0 a 5 anos deve ser utilizados E/I, P/I, P/E e IMC/I, para crianças entre 5 e 10 anos E/I, P/I e IMC/I e para adolescentes E/I e IMC/I (BRASIL, 2004; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a).

Na literatura, os dados de desenvolvimento de crianças com MSUD são escassos e, na maior parte das vezes, referem-se a populações nas quais o diagnóstico precoce é uma realidade. Um estudo multicêntrico realizado no Brasil concluiu que quase todos os pacientes com a doença apresentavam algum nível de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, variando de leve (38%) a grave (26%). Essa mesma pesquisa demonstrou que 74% dos pacientes avaliados tinham estado nutricional inadequado (HERBER, 2012).

1.2.13 Avaliação de consumo alimentar

Diversos são os métodos de avaliação de consumo alimentar descritos na literatura, sendo o recordatório de 24 horas um dos mais tradicionais e bem aceitos pelos pacientes. Essa técnica consiste na obtenção de informações relativas ao consumo de alimentos e bebidas nas 24 horas anteriores ou no dia anterior ao inquérito (BUENO e CZEPIELEWSKI, 2010; WILLETT, 1998). Sua utilização apresenta diversas vantagens como ser de aplicação rápida, necessitar de recordação recente do consumo (BUZZARD, 1998) e, sendo um método retrospectivo, não promover alteração da ingestão alimentar. O entrevistado não precisa ser alfabetizado, entretanto, é um método dependente de sua memória, cooperação

e da interação com o entrevistador (VILLAR, 2001). A coleta de dados deve ser cuidadosa, buscando obter o máximo de informação a respeito de porções e forma de preparo dos alimentos.

No caso de crianças recomenda-se que as informações de consumo alimentar sejam obtidas da mãe ou responsável até a idade de sete anos. A partir dessa idade o inquérito deve ser realizado abordando-se a criança e solicitando-se auxílio ao responsável apenas quando necessário (VITOLLO, 2008).

Os dados obtidos nos inquéritos alimentares devem ser adequadamente tratados para que se tenha uma estimativa fidedigna do consumo dos nutrientes de interesse. Para tanto podem ser utilizados os dados da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (BRASIL, 2011), que traz informações nutricionais a respeito dos alimentos mais habitualmente consumidos pela população brasileira. Uma das complicações do tratamento nutricional de crianças com MSUD é que as tabelas utilizadas e os rótulos de alimentos não possuem informações quanto ao teor de cada aminoácido nos alimentos, devendo essas quantidades ser inferidas a partir do teor de proteína relatada e das concentrações de cada aminoácido nos diversos grupos de alimentos (ACOSTA e YANNICELLI, 2001).

Dentre a ampla gama de enfermidades atendidas no Ambulatório de EIM do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) a MSUD configura-se como a mais frequente dentre as aminoacidopatias. Os cinco pacientes atendidos atualmente no serviço são provenientes de diversas regiões do estado de Minas Gerais e recebem, além de atenção médica, acompanhamento nutricional periódico. Sendo uma doença de tratamento em longo prazo essencialmente nutricional e cuja evolução é diretamente dependente de adequado controle dietético, a presença de um profissional nutricionista na equipe de atendimento é de grande importância.

Um estudo multicêntrico realizado no Brasil em 2012 identificou 83 pacientes já diagnosticados com MSUD em todo o país, estando apenas 48 em acompanhamento periódico atualmente. Destes, somente 55% tem atendimento com nutricionista e a inadequação do estado nutricional é, como citado anteriormente, extremamente prevalente (HERBER, 2012).

A precariedade do tratamento desses pacientes em nosso país é também evidenciada pela dificuldade de investigação diagnóstica e acesso a exames laboratoriais necessários ao acompanhamento clínico. Além disso, não existem intervalos de referência estabelecidos em nossa população, sendo tradicionalmente utilizados dados de literatura internacional (LEPAGE et al., 1997; SHAPIRA et al., 1989; STRAUSS et al., 2010). Todos esses fatores contribuem para o diagnóstico tardio, pobre controle clínico e laboratorial e conseqüente evolução desfavorável desses pacientes.

Diante desse contexto, o presente estudo se justifica pela contribuição para a melhoria do tratamento dos pacientes com MSUD. Para tal fim, procuramos estabelecer intervalos de referência próprios para nossa população, tanto para aminoácidos séricos como para seu influxo cerebral, como forma de otimizar a conduta nutricional. Além disso, o estudo consiste, em nosso conhecimento, no primeiro trabalho brasileiro de caracterização do perfil genético de pacientes com MSUD.

3.1 Objetivo geral

Avaliar os pacientes com MSUD quanto aos aspectos clínicos e moleculares, bem como caracterizar o impacto do tratamento dietético a partir do estudo do perfil de aminoácidos.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a evolução clínica e o desenvolvimento neuropsicomotor dos pacientes com MSUD.
- Avaliar a ingestão dietética e o estado nutricional dos pacientes.
- Estabelecer intervalos de referência para aminoácidos séricos e influxo cerebral de aminoácidos em nossa população, na faixa etária estudada.
- Quantificar a concentração sérica e estimar o influxo cerebral de aminoácidos em pacientes com MSUD, comparando com os intervalos de referência obtidos.
- Caracterizar geneticamente os pacientes com MSUD e descrever possíveis novas mutações.

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG, Unidades Funcionais de Pediatria e de Patologia e Medicina Laboratorial (UFPLM-HC-UFMG), Comitê de Ética em Pesquisa (COEP-UFMG) sob o número CAAE – 08169212.2.0000.5149 (Anexo 1) e Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão, processo número 131/12 (DEPE-HC-UFMG) (Anexo 2).

4.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo longitudinal, prospectivo e retrospectivo, no qual os pacientes com MSUD foram acompanhados mensalmente no Ambulatório de EIM (HC-UFMG). Os indivíduos que constituíram o grupo controle foram selecionados no Setor de Coleta Ambulatorial (UFPML-HC-UFMG).

4.3 Pacientes

Participaram do estudo seis pacientes com MSUD, na faixa etária de 2 a 14 anos. Para análise de aminoácidos foram incluídos apenas cinco pacientes, pois uma criança foi a óbito antes do início do estudo, sendo possível apenas sua caracterização clínica e molecular. Todas as crianças apresentaram a forma clássica da doença e estavam em tratamento dietético e suplementação com fórmula metabólica especial.

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes em acompanhamento periódico no Ambulatório de EIM, com diagnóstico confirmado de MSUD, tendo este sido efetuado ou não nesse serviço. A inclusão no estudo foi condicionada ao consentimento dos pais ou responsáveis e da criança, quando pertinente, por meio da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). A amostra foi composta por três crianças menores de 6

anos, situação na qual apenas os pais assinaram o TCLE; uma criança de 7 anos, que assinou juntamente com os pais; e um adolescente de 14 anos incapacitado de assinar devido a limitações de desenvolvimento, sendo o consentimento obtido dos pais e o paciente informado no limite de suas capacidades, conforme orientações do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP-UFMG).

4.4 Grupo controle

O grupo controle foi constituído de indivíduos com idade entre 2 e 14 anos, de ambos os sexos. O número amostral foi estipulado através de cálculo de amostra aleatória simples, para situações em que o tamanho populacional é desconhecido e considerando uma distribuição normal dos valores de aminoácidos séricos na população. O erro máximo permitido foi de 15, nível de confiança de 95% e foram utilizados valores de desvio padrão para cada um dos aminoácidos de interesse descritos na literatura (STRAUSS et al., 2010). O tamanho amostral ideal foi definido como o valor máximo obtido por esse cálculo e, adaptado à viabilidade de coleta, resultou em uma amostra de 60 indivíduos, suficiente para atender ao número amostral estipulado para 15 dos 17 aminoácidos analisados. A figura 4 ilustra a distribuição do grupo por sexo e idade.

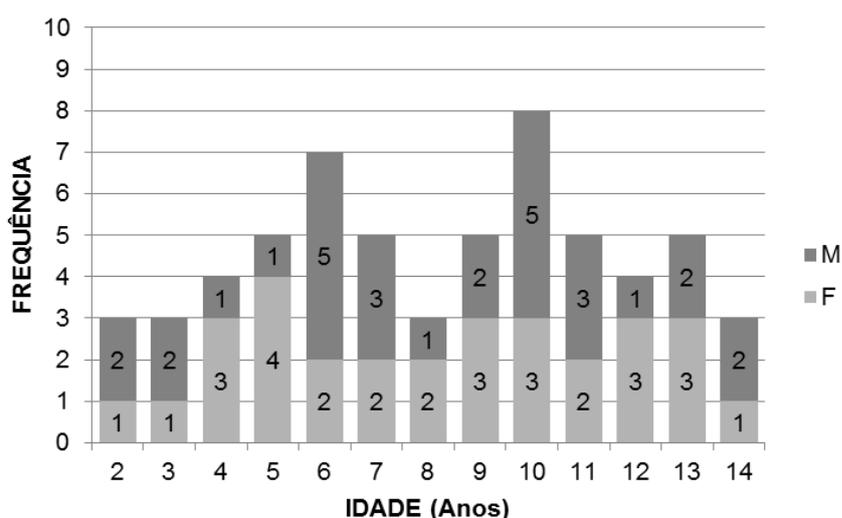


Figura 4: Distribuição dos indivíduos do grupo controle segundo idade e sexo. Foram incluídos indivíduos de todas as idades na faixa etária de 2 a 14 anos. Os números nas barras representam a quantidade de crianças de cada sexo.

4.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas crianças saudáveis, que compareceram ao Setor de Coleta Ambulatorial (UFPML-HC-UFMG) para realização de exames de rotina. A inclusão na amostra foi condicionada à assinatura de TCLE pela criança e/ou pais ou responsáveis, de acordo com a idade (Apêndice 2). Todos os indivíduos responderam a um questionário informando data de nascimento, clínica de origem, doenças prévias, uso de medicamentos, tempo de jejum e presença de vômitos.

4.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas crianças com história de baixa estatura ou ganho de peso insuficiente para a idade, que apresentavam quadro de vômitos ou jejum com duração superior a um dia ou que estavam em utilização de substâncias conhecidamente interferentes do perfil sérico de aminoácidos no período da coleta, como ácido ascórbico, aspartame, aspirina, associação sulfametoxazol/trimetoprima, glicose, indometacina, progesterona, testosterona e valproato. Excluíram-se, também, crianças em pré ou pós-transplante, com doença hepática ou renal, diabetes tipo 1, anemia falciforme, leucemias e outras doenças oncológicas, fibrose cística, síndromes genéticas e dismorfismos, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), sífilis, visceromegalias e alterações hematológicas em investigação, doenças autoimunes, distúrbios endócrinos e hormonais (SHIH, 2003).

4.5 História clínica, avaliação do crescimento e desenvolvimento

A história clínica dos pacientes foi coletada nos prontuários médicos para obtenção de informações referentes à consanguinidade dos pais, idade do diagnóstico, apresentação clínica, tratamentos anteriores, desenvolvimento neuropsicomotor, exames moleculares, entre outros. Esses dados foram complementados com entrevista direta aos pais. Durante o andamento do estudo os pacientes foram avaliados com periodicidade de um mês, quando foi realizado exame físico, avaliação do desenvolvimento infantil e anotação de intercorrências no período.

As medidas antropométricas aferidas foram peso e comprimento/estatura. Crianças com idade inferior a dois anos foram pesadas em balança pediátrica digital Balmak®, com precisão de 0,005 Kg e capacidade máxima de 25 Kg e o comprimento foi aferido na posição horizontal, com estadiômetro pediátrico. Para as crianças maiores de dois anos foi utilizada balança digital Balmak®, precisão de 0,05 Kg e capacidade máxima de 150 Kg e estadiômetro vertical para medida de estatura. Bebês foram pesados sem roupas ou fralda e crianças descalças, com roupas leves, pés juntos e braços estendidos, conforme metodologia de referência (BRASIL, 2004). Crianças com idade superior a dois anos, mas que não deambulam, foram pesadas juntamente com um dos responsáveis e seu peso inferido por subtração e medidas com fita métrica inextensível, em posição horizontal. Todas as medidas foram feitas em duplicata. Os valores de peso (P) e estatura (E) foram utilizados para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), segundo a equação 1:

(1)

$$\text{IMC (Kg/m}^2\text{)} = \frac{\text{P (Kg)}}{\text{E (m)}^2}$$

Essas aferições foram agrupadas e, juntamente com a idade (I) dos pacientes, utilizadas para cálculo dos índices de avaliação nutricional recomendados para cada faixa etária. Para crianças menores de 5 anos foram utilizados E/I, P/I, P/E e IMC/I; com idade entre 5 e 10 anos E/I, P/I e IMC/I; e para adolescentes de 10 a 19 anos E/I e IMC/I. A avaliação desses índices se deu por meio de curvas e classificações apropriadas para o acompanhamento de crianças e adolescentes por escores-z (Quadros 3 e 4). A medida do perímetro cefálico (PC) foi tomada com fita métrica inextensível e não elástica, no ponto imediatamente acima das sobrancelhas e orelhas. O padrão de referência utilizado foi o descrito por Nelhaus em 1968, que pode ser aplicado até a idade de 18 anos.

Quadro 3 – Classificação do estado nutricional de crianças e adolescentes por E/I e P/I segundo escores-z

Escores-z	Classificação	Escores-z	Classificação
	E/I		P/I
<-3	Muito baixa estatura para idade	<-3	Muito baixo peso para idade
≥-3 e <-2	Baixa estatura para idade	≥-3 e <-2	Baixo peso para idade
≥-2	Estatura adequada para idade	≥-2 e ≤+2	Peso adequado para idade
		>+2	Peso elevado para idade

Fonte: WHO, 2006c

Quadro 4 – Classificação do estado nutricional de crianças e adolescentes por P/E e IMC/I segundo escores-z

Escore-z	Classificação	
	P/E e IMC/I (0 a 5 anos)	IMC/I (5 a 19 anos)
< -3	Magreza acentuada	Magreza acentuada
≥-3 e <-2	Magreza	Magreza
≥-2 e ≤+1	Eutrofia	Eutrofia
>+1 e ≤+2	Risco de sobrepeso	Sobrepeso
>+2 e ≤+3	Sobrepeso	Obesidade
>+3	Obesidade	Obesidade grave

Fonte: WHO, 2006c

4.6 Avaliação do consumo alimentar

No dia da coleta de sangue para dosagem de aminoácidos foi realizado inquérito alimentar, com o formato de recordatório de 24 horas. Os responsáveis foram orientados a relatar o consumo de alimentos e bebidas pelas crianças no dia anterior à consulta, buscando o maior detalhamento possível. A partir dos dados fornecidos foi utilizado o software de nutrição Dietpro® 5i para cálculo das quantidades ingeridas de energia e proteína, baseando-se em informações de tabelas de composição de alimentos brasileiras (BRASIL, 2011; PINHEIRO et al., 2005) e informações dos fabricantes no caso de alimentos industrializados. A ingestão de cada aminoácido (leucina, isoleucina e valina) foi inferida a partir da quantidade de proteína nos alimentos consumidos e fatores de conversão descritos na literatura, que levam em conta a concentração de cada um desses aminoácidos nas proteínas, variando conforme grupo alimentar (Tab. 2).

Tabela 2 – Teor dos AACR nas proteínas dos diversos grupos alimentares

Alimentos	Teor do aminoácido na proteína (%)		
	Leucina	Isoleucina	Valina
Pães e Cereais	7,0	3,6	5,0
Frutas	4,2	2,8	3,7
Vegetais	5,0	3,7	4,0

Fonte: Adaptado de ACOSTA e YANNICELLI, 2001

4.7 Análise de aminoácidos

4.7.1 Coleta e processamento de amostras

A coleta de amostras foi realizada no Setor de Coleta Ambulatorial (UFPML-HC-UFMG), após jejum preconizado de 8 a 12 horas tanto para pacientes quanto para o grupo controle. Foram coletados 4 mL de sangue venoso em tubo estéril tipo vacutainer com EDTA. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos para a separação do plasma e este imediatamente congelado à temperatura de -20°C até o momento da análise, que foi feita em período máximo de 15 dias.

4.7.2 Dosagem de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A dosagem sérica de aminoácidos foi realizada com periodicidade mensal durante um período de três meses no grupo de pacientes e uma única vez para cada indivíduo do grupo controle. As análises foram realizadas no Núcleo Técnico Operacional (NTO) do Laboratório Hermes Pardini, em cromatógrafo *Waters Alliance e2795*®, coluna *Accucore C₁₈* (150 x 4,6 mm, 2,6 µm) *Thermo Scientific*®, acoplado a detector de fluorescência *Waters 2475*®.

Foi utilizada tecnologia *in house* validada pela instituição segundo ensaios de efeito de matriz, exatidão, limites de detecção, linearidade, precisão, reprodutibilidade e concordância interlaboratorial. A técnica consistiu no estabelecimento de um gradiente de pH para separação dos analitos, utilizando uma fase móvel A composta por tampão fosfato, água e metanol (57/33/30 %v/v) de pH 6,5 e uma fase móvel B, composta por tampão fosfato e metanol (47/53 % v/v) de pH 8,5. Para padronização do método foram utilizados padrões grau HPLC de 17 aminoácidos *Sigma-Aldrich*®: aspartato, glutamato, asparagina, serina, histidina, glutamina, arginina, treonina, glicina, tirosina, alanina, triptofano, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina e leucina. O volume de injeção padronizado foi de 1 µL e tempo de corrida de 110 minutos.

Para a análise das amostras biológicas foram adicionados em *ependorf* 20 µL de plasma e 100 µL de solução derivatizante de OPA, preparado com mercaptoetanol, etanol e tampão borato em meio básico (pH 9,5). Essa solução foi homogeneizada com auxílio de pipeta e mantida em repouso em temperatura ambiente por 1 minuto para a completa

derivatização. Após esse período, 100 µL foram transferidos para *insert* dentro de *vial* para injeção no equipamento. A concentração de cada aminoácido foi dada em nmol/mL.

4.7.3 Estimativa de influxo cerebral

O influxo de aminoácidos na barreira hematoencefálica foi estimado por meio de suas concentrações séricas, utilizando as equações 3 e 4 (SMITH e STOLL, 1998), onde K_m representa a constante de afinidade de Michaelis para o aminoácido de interesse, C_i a concentração plasmática em µM de cada um dos competidores e K_{mi} a constante de afinidade clássica dos competidores. O $K_{m_{app}}$ obtido, que representa o K_m aparente na presença de competidores, foi então utilizado para estimar o influxo cerebral em nmols/min/g de tecido cerebral de cada aminoácido do grupo, sendo $V_{máx}$ um valor tabelado para a saturação máxima de transporte e C a concentração sérica do aminoácido em estudo.

(3)

$$K_m (app) = K_m \left[1 + \sum \left(\frac{C_i}{K_{mi}} \right) \right]$$

(4)

$$\text{Influxo} = \frac{(V_{máx}/C)}{[K_m(app) + C]}$$

4.8 Análise molecular

O estudo molecular dos pacientes com MSUD foi realizado previamente a esse trabalho e os laudos foram obtidos nos respectivos registros médicos. A investigação se baseou no sequenciamento completo dos éxons e regiões intrônicas flanqueadoras dos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT e foi realizada pelo Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), em Portugal, por meio de sequenciador automático ABI 3100 da *Applied Biosystems*® e DNA extraído de sangue em papel filtro. As sequências de referência utilizadas estão descritas no quadro 5. Os resultados foram interpretados de forma a determinar o tipo de mutação, inferir a alteração na proteína e sua

patogenicidade e verificar a descrição prévia da mutação utilizando-se a base de dados HGMD (CARDIFF UNIVERSITY, 2011).

Quadro 5 – Sequências de referência utilizadas no sequenciamento dos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT

Gene	BCKDHA	BCKDHB	DBT
DNA	NT_011109	NT_007299	NT_032977
mRNA	NM_000709.2	NM_000056.2	NM_001918.1
Proteína	NP_000700.1	NP_898871.1	NP_001909.1

Fonte: NCBI, 2012

4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os *softwares* Excel 2010®, R 2.15.2®, Medcalc® e Reference Value Advisor®. Os valores de cada um dos aminoácidos séricos e de influxo cerebral do grupo controle foram testados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os valores de média e desvio padrão dos dados com distribuição normal foram utilizados para cálculo dos intervalos de referência, considerando-se como normal a faixa compreendida entre $\pm 1,96$ DP. Para aminoácidos com distribuição não normal foi utilizada a metodologia não paramétrica de determinação de intervalos de referência, considerando-se os percentis P2,5 e P97,5 como os limites inferior e superior, respectivamente. A detecção de prováveis *outliers* foi testada pelo método de Reed (REED, HENRY e MASON, 1971). Os intervalos de referência foram também calculados segundo o método robusto, após transformação de Box-Cox quando os dados brutos não apresentavam simetria (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008). Para o método de distribuição normal e método robusto foram gerados intervalos de confiança de 90% para os limites inferior e superior. Os valores dos aminoácidos séricos e de influxo cerebral do grupo de pacientes foram transformados em escores padronizados ou percentis, em relação ao grupo controle e apresentados em gráficos. Dados descritivos foram apresentados como mediana e intervalos interquartis (IQ) 25 e 75. Para a comparação de médias foi utilizado o teste de t de Student e de medianas o teste de Wilcoxon. Para a análise de correlações foram utilizados os testes de Pearson para dados paramétricos e teste de Spearman para dados não paramétricos. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

5.1 Caracterização clínica

5.1.1 *Paciente 1*

Criança do sexo masculino, nascido em Vespasiano (MG) em 24/12/1998, primeiro filho de casal consanguíneo, primos de 1º grau. Ao nascimento apresentou peso, comprimento e perímetro cefálico normais e teve alta da maternidade com a mãe. Recebeu leite materno por mamadeira, pois não apresentou sucção adequada no seio materno, complementado com fórmula infantil a partir dos 7 dias de vida. Aos 9 dias iniciou quadro de vômitos, odor atípico no suor, hipoatividade progressiva, dificuldade de sugar, hipoglicemia, acidose, choro fraco, discreta movimentação de membros e deixou de acompanhar movimentos com o olhar. Foi internado para propedêutica aos 15 dias de vida e constatado acidose metabólica, hipotonia axial, hiperreflexia e hipertonicidade de membros. Nesse período foi alimentado com fórmula infantil por sonda nasointestinal devido à dificuldade de sucção. Teve alta hospitalar com diagnóstico de refluxo gastroesofágico, hipoglicemia por ingestão insuficiente, pneumonia, sucção débil e quadro neurológico a esclarecer. O cariótipo não evidenciou alterações cromossômicas e, apesar da cromatografia qualitativa de aminoácidos ter mostrado aumento de leucina ou isoleucina, o resultado parece não ter sido valorizado. Os exames de imagem evidenciaram extenso acometimento de substância branca encefálica, com suspeita de processo desmielinizante secundário a doença de Canavan, laudo que confundiu os médicos.

Aos 4 meses de idade a criança foi internada novamente por um período de 10 dias, com hipotonia generalizada, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e baixo peso para a idade. Foi diagnosticada pneumonia aspirativa atribuída à dificuldade de sucção presente desde o nascimento. Apresentando crises convulsivas, a criança permaneceu internada em uso de ventilação mecânica, antibioticoterapia e anticonvulsivantes. Após reconhecimento da criança pela enfermagem devido ao cheiro de sua urina, foi realizada cromatografia quantitativa de aminoácidos no plasma. O exame evidenciou concentração de leucina oito vezes acima do valor máximo de referência e aumentos significativos de isoleucina e valina, sendo confirmado o diagnóstico de MSUD e iniciado tratamento dietético com fórmula metabólica especial, porém em serviço não especializado e sem controle laboratorial. A criança evoluiu com melhora clínica importante e resolução do quadro convulsivo, embora ainda mantivesse baixo peso para a idade e acidose metabólica.

Aos 9 meses de idade foi encaminhado ao Ambulatório de EIM (HC-UFMG), já em recuperação do peso e estatura para a idade, mas com evidente atraso do desenvolvimento

e em descompensação metabólica. Na sua evolução, com idade de 1 ano e 3 meses tinha estrabismo convergente, sinal de pseudo Babinski bilateral, não apresentava sustento cefálico e não segurava objetos. Foi ajustada a dieta e iniciada suplementação de tiamina, suspensa devido a relato de piora do sono e ausência de resposta clínica importante.

Aos 3 anos de idade pegava objetos e era capaz de transferi-los de uma mão para a outra. Aos 8 anos tinha sustento cefálico ainda parcial, sentava sem apoio e tentava falar. Evoluiu com adequado ganho de peso e estatura, sem ganhos expressivos no desenvolvimento. Tinha constipação intestinal crônica. Aos 12 anos foi submetido à cirurgia de fásia muscular em região ântero-lateral para correção de pés equinos e, então, começou a dar passos com apoio.

Aos 14 anos, o paciente tem microcefalia, baixo peso e estatura adequada, porém limítrofe, para a idade (Fig. 5 e 6). Tem contato social pobre, senta sem apoio por alguns instantes, não anda, não segura objetos, vocaliza, mas não forma palavras. Alimenta-se adequadamente por via oral, consistência sólida, sem dificuldades de mastigação ou deglutição. Não controla esfínteres, tem constipação intestinal crônica, em uso de polietilenoglicol (PEG). Faz diversos tratamentos de reabilitação, como fisioterapia, equoterapia e natação e não faz uso de medicamentos. Desde os 9 meses não teve mais crises de descompensação metabólica aguda.

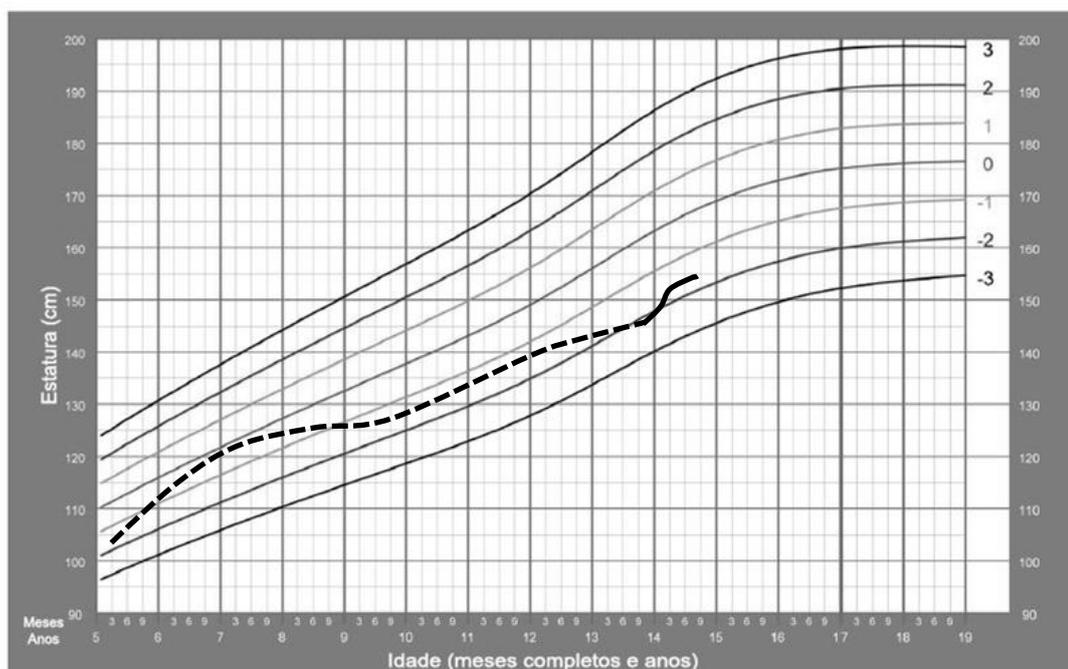


Figura 5: Paciente 1 – Estatura/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de DE ONIS et al. 2007

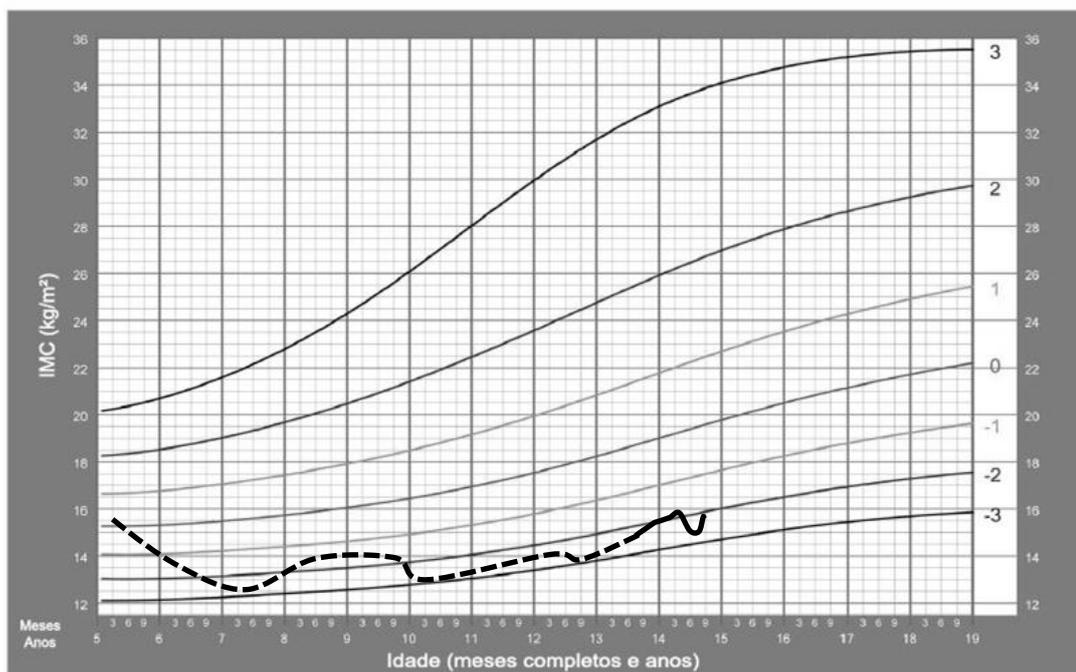


Figura 6: Paciente 1 – IMC/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário

Fonte: Adaptado de DE ONIS et al. 2007

5.1.2 Paciente 2

Criança do sexo feminino, nascida em 19/01/2005, natural da zona rural de Baependi (MG). É a quarta filha de casal não consanguíneo, todos os irmãos hígidos. Sem intercorrências na gestação, nasceu a termo, de parto cirúrgico e teve alta com a mãe. Aos 6 dias de vida iniciou com hipoatividade, vômitos, prostração, fezes amolecidas e dificuldade de sucção. Foi internada aos 12 dias de vida e evoluiu com parada respiratória, sendo transferida para o Centro de Terapia Intensiva (CTI). Permaneceu em ventilação mecânica, recebendo fórmula infantil por sonda nasoentérica por 15 dias, com convulsões de difícil controle e apneia. Durante a internação foi realizada propedêutica para EIM, com exame de DNPH positivo e aumento da concentração sérica de leucina, isoleucina e valina identificado por cromatografia qualitativa. Foi, então, estabelecido diagnóstico de MSUD e iniciada dieta com 1 mês e 20 dias de vida. À época apresentava clônus esgotável, nistagmo horizontal, fixava pouco o olhar, sorria e se assustava com barulhos. Com 4 meses de idade foi novamente internada para a continuidade do tratamento devido à dificuldade na obtenção da fórmula metabólica especial na cidade de origem. Recebeu, ainda, complementação com os aminoácidos valina, alanina, glutamina, além de tiamina para teste de responsividade ao

cofator, sem resposta clínica importante. Apresentava peso normal, porém tinha baixa estatura para a idade e microcefalia.

Com 1 ano de idade tinha atraso importante no desenvolvimento: sentava sem apoio, passava objetos de uma mão para a outra, mas ainda não engatinhava. Aos 2 anos não andava, reconhecia partes do corpo, apontava, segurava a mamadeira sozinha e rabiscava. Peso e estatura adequados, perímetro cefálico normal, sinal de pseudo Babinski bilateral e estrabismo.

Aos 3 anos e meio foi observada queda acentuada de cabelo e realizado exame quantitativo de aminoácidos. Constatou-se a deficiência de leucina e isoleucina e houve resolução do quadro após ajuste da dieta. Aos 4 anos ficava em pé e começou a andar com apoio, com flexão dos joelhos e na ponta dos pés, sendo submetida à tenotomia de adutores curtos e longos aos 6 anos de idade para melhora do padrão de deambulação.

Com 8 anos de idade anda com apoio e usando tutor, dá poucos passos sozinha. Acompanha com oftalmologista devido a estrabismo e faz uso de tampão ocular e óculos. Interage bem, conhece as letras e escreve o próprio nome, mas verbaliza com dificuldade. Faz fisioterapia, natação e acompanhamento com fonoaudiologia. Alimenta-se normalmente por via oral, não faz uso de medicamentos e tem hábito intestinal normal. Peso, estatura e perímetro cefálico adequados para a idade (Fig. 7, 8 e 9).

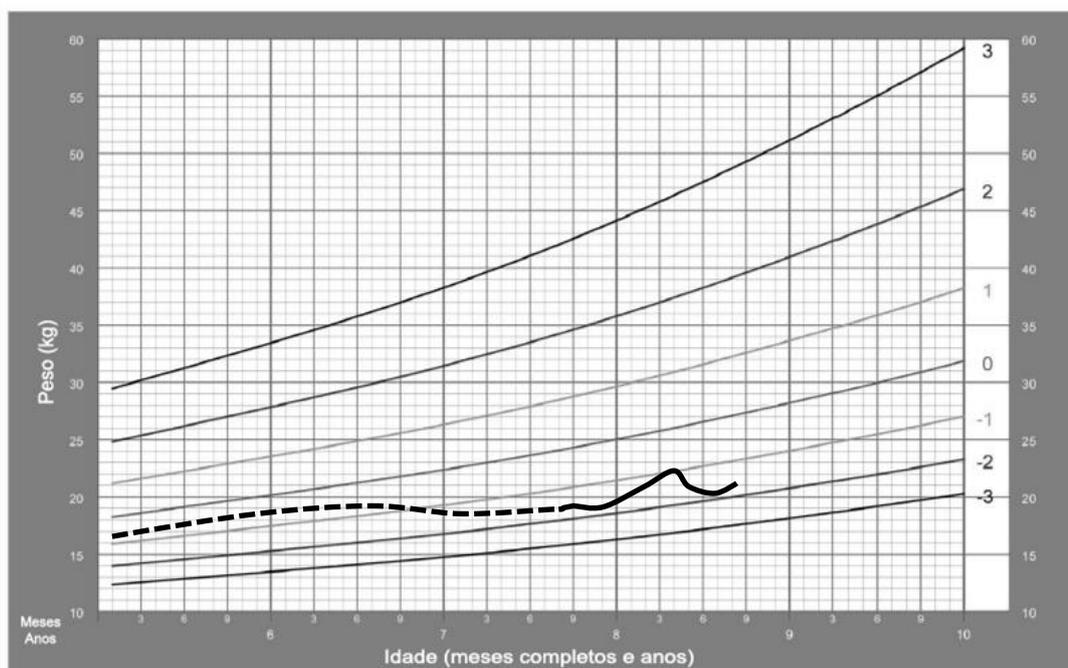


Figura 7: Paciente 2 – Peso/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

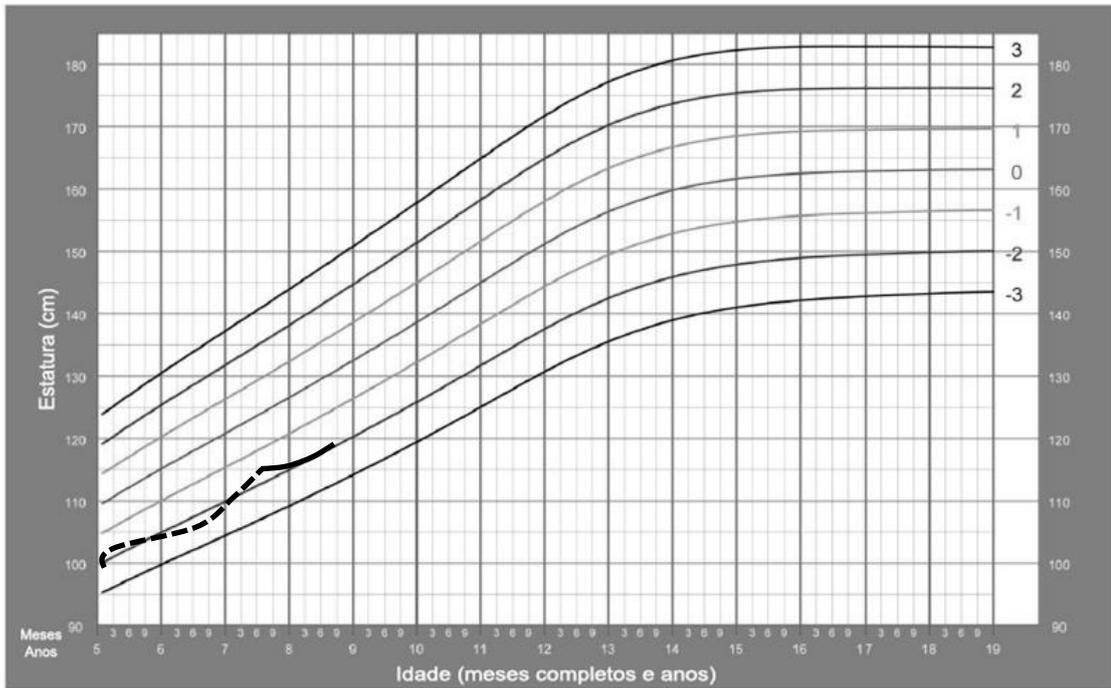


Figura 8: Paciente 2 – Estatura/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de DE ONIS et al. 2007

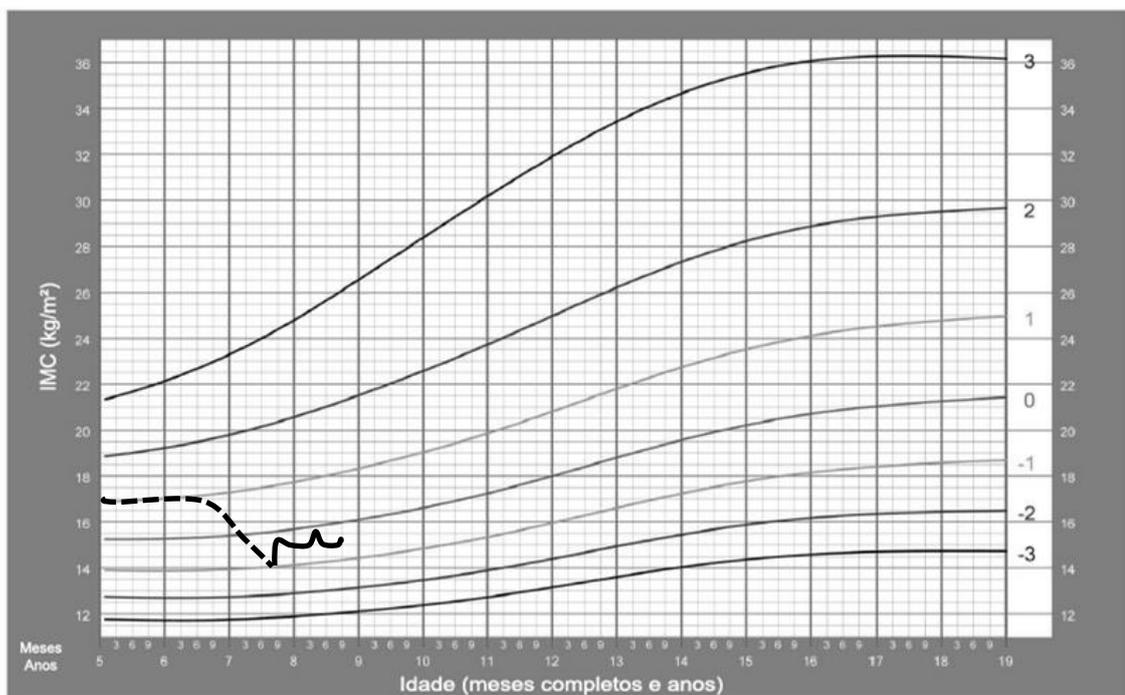


Figura 9: Paciente 2 – IMC/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de DE ONIS et al. 2007

5.1.3 *Paciente 3*

Criança do sexo feminino, natural de Belo Horizonte (MG), nascida em 11/10/2008. Primeira filha de casal jovem, sadio e não consanguíneo, nasceu de parto cirúrgico a termo, com peso e comprimento adequados e teve alta com a mãe. Aos 4 dias de vida iniciou quadro de hipotonia axial alternada com hipertonia, opistótono e movimentos de pedalar, evoluindo com engasgos, prostração e baixa aceitação da dieta. Com 9 dias de vida foi internada com suspeita de meningite, hipoglicemia e convulsões de difícil controle. Aos 12 dias de vida evoluiu com desidratação, fontanela abaulada, apneia, movimentos tônico-clônicos e reflexos primitivos ausentes sendo encaminhada ao CTI. Iniciada antibioticoterapia diante da suspeita de sepse e controle das convulsões com uso de medicamentos.

No segundo dia de internação foi realizada coleta de sangue para dosagem quantitativa de aminoácidos, mas o resultado só foi disponibilizado após 11 dias. O exame revelou aumento de leucina, vinte vezes acima do valor máximo de referência, e de isoleucina e valina, aproximadamente o dobro do valor normal, sendo confirmado o diagnóstico de MSUD com 23 dias de vida. Foi iniciada nutrição parenteral com baixo aporte de aminoácidos e rica em lipídeos e glicose por 5 dias, até a obtenção de fórmula especial. Após esse período foi instituído tratamento dietético enteral com fórmula metabólica especial, adicionada de polímeros de glicose e triglicerídeos de cadeia média (TCM) para adequado aporte calórico. Além disso, foi iniciada suplementação com tirosina, valina e isoleucina e realização de cromatografia de aminoácidos semanalmente. Após 10 dias foi liberada dieta por via oral e retirada sonda nasoentérica e a paciente teve alta após 41 dias de internação.

A primeira ressonância magnética realizada durante a internação mostrava áreas sugestivas de isquemia extensa em tronco cerebral, núcleos da base, cápsula interna e hemisférios cerebrais. A repetição do exame ao final da internação evidenciava melhora importante, porém mantendo áreas de desmielinização difusas. Os anticonvulsivantes foram retirados após novo eletroencefalograma normal (VALADARES, OLIVEIRA e TÁLAMO, 2010).

Aos 2 meses de idade a criança apresentou lesões dermatológicas extensas hiperemiadas nas nádegas, região perianal, occipital, membros inferiores e superiores associadas à deficiência de aminoácidos, com melhora do quadro após ajustes dietéticos. Com 4 meses apresentava adequado sustento cefálico e acompanhava o examinador com o

olhar, tinha peso adequado, mas mantinha baixa estatura para a idade. Evoluiu com ganhos do desenvolvimento, aos 8 meses sentava sozinha, interagia com o examinador, segurava objetos e os passava de uma mão para outra. Sem convulsões, mas mantinha nistagmo. Nesse período foi observada normalização da estatura.

Aos 2 anos e 2 meses andou sem apoio, em uso de tutor e na ponta dos pés. Presença de clônus plantar e pseudo Babinski bilateral, hiperreflexia em membros superiores, estrabismo convergente de leve a moderado e microcefalia. Família relatava aparecimento de odor adocicado na urina na presença de quadro infeccioso. Avaliação fonoaudiológica identificou deglutição eficaz e segura, porém alterações de fala e linguagem não compatíveis com a idade.

Com 4 anos a criança apresenta bom desenvolvimento, frequenta escola regular, conta histórias, interage bem. Foi realizada cirurgia corretiva de fásia muscular devido a pés equinos, com sucesso. Anda sem apoio, com uso de tutor, sobe escadas apoiando-se nos corrimões, mantém hiperespasticidade em membros inferiores e limitação da extensão dos joelhos, além de estrabismo leve. Não faz uso de medicamentos, alimenta-se normalmente por via oral e tem hábito intestinal normal. Peso, estatura e perímetro cefálico adequados para a idade (Fig. 10, 11, 12 e 13).

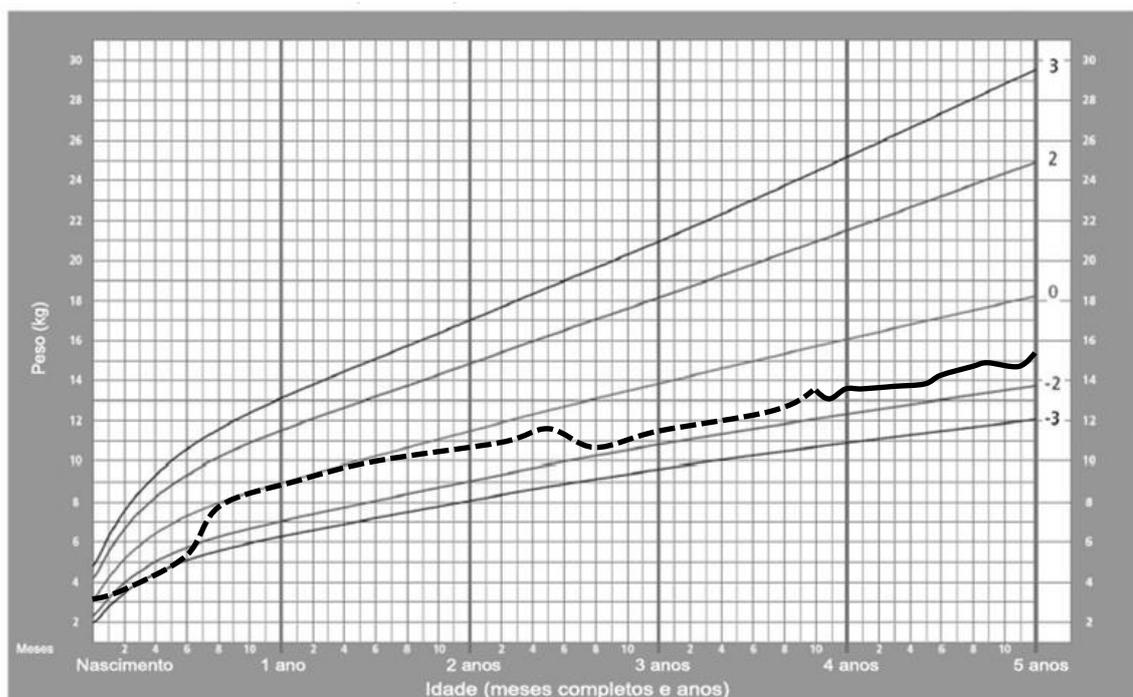


Figura 10: Paciente 3 – Peso/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

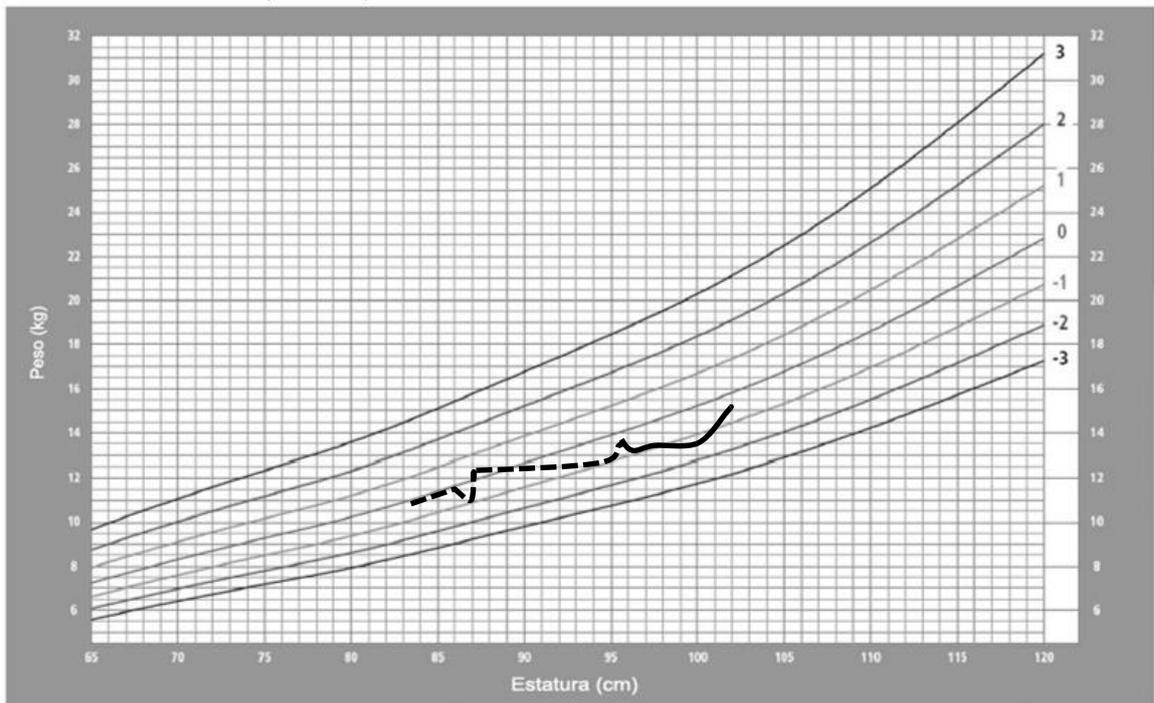


Figura 11: Paciente 3 – Peso/estatura: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

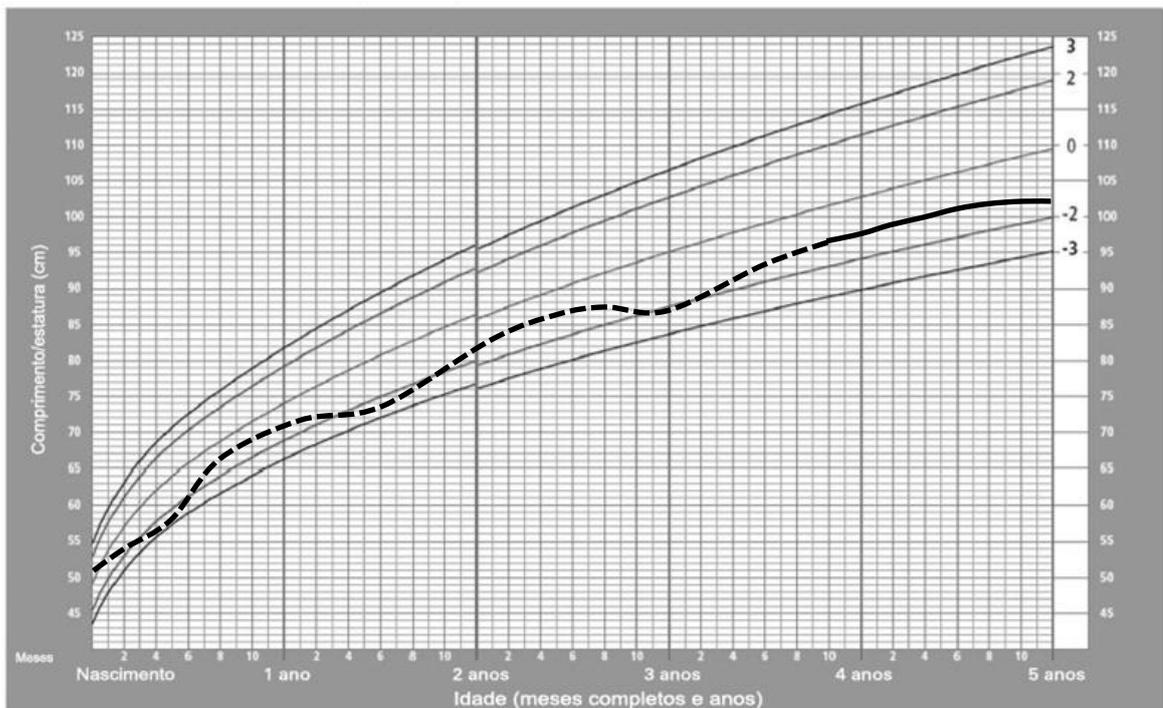


Figura 12: Paciente 3 – Estatura/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

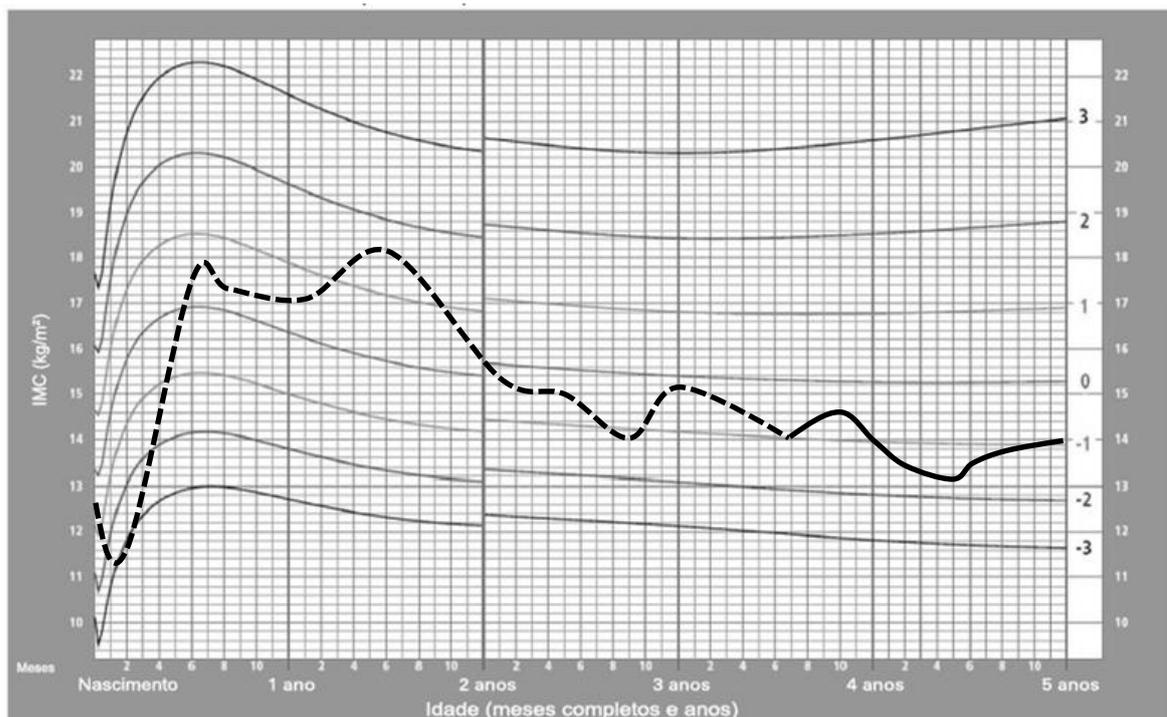


Figura 13: Paciente 3 – IMC/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

5.1.4 Paciente 4

Criança nascida em 18/12/2008, sexo feminino, natural de Diamantina (MG). Terceira filha de casal consanguíneo, primos de 2º grau. Gravidez planejada, sem intercorrências, parto cirúrgico a termo, com peso e comprimento adequados. Pais já haviam perdido um filho que nasceu com agenesia unilateral de antebraço e que aos 7 dias de vida iniciou sintomas de hipotonia, choro fraco e sucção débil, evoluindo para óbito com 11 dias de vida.

Também aos 7 dias, a criança iniciou quadro de sonolência, fontanela tensa e dificuldade de sucção. Depois de dois meses internada em Diamantina, em uso de sonda nasoentérica, foi transferida para hospital de Belo Horizonte, onde foi levantada suspeita de EIM. Coletada amostra para cromatografia quantitativa de aminoácidos, que confirmou o diagnóstico de MSUD. A dieta com fórmula especial foi iniciada aos 3 meses de idade, por meio de doação de outros pacientes, pois o caso estava aguardando solução judicial. Nessa época a criança apresentava baixo peso, muito baixa estatura para a idade e microcefalia.

Aos 8 meses firmou a cabeça, juntava as mãos, dava gargalhada, vocalizava, não rolava na cama e não sentava, caracterizando atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Com 1 ano de idade apresentou níveis séricos baixos de leucina, isoleucina e valina, resultando em lesões de pele, com melhora após ajuste dietético. Durante o acompanhamento clínico mostrou recuperação do peso e incremento do perímetro cefálico, mas manteve baixa estatura para a idade.

Com 3 anos de idade foi constatada subluxação no quadril, não sendo indicado tratamento cirúrgico. Com essa idade a criança vocalizava, apontava partes do corpo, ficava sentada sem apoio apenas por alguns minutos e não andava. Apresentava-se espástica, com clônus esgotável em membros inferiores e estrabismo divergente. Teve um episódio de varicela, sem descompensação metabólica ou necessidade de internação.

Aos 4 anos tem peso e perímetro cefálico adequados para a idade, mas mantém baixa estatura importante (Fig. 14, 15, 16 e 17). Senta sem apoio, troca passos com auxílio da mãe, na ponta dos pés. Vocaliza, mas não forma palavras. Reconhece pessoas, aponta partes do corpo e objetos. Tem clônus esgotável e estrabismo. Faz fisioterapia, não faz uso de medicamentos. Alimenta-se por via oral, sem dificuldades de deglutição, hábito intestinal constipado.

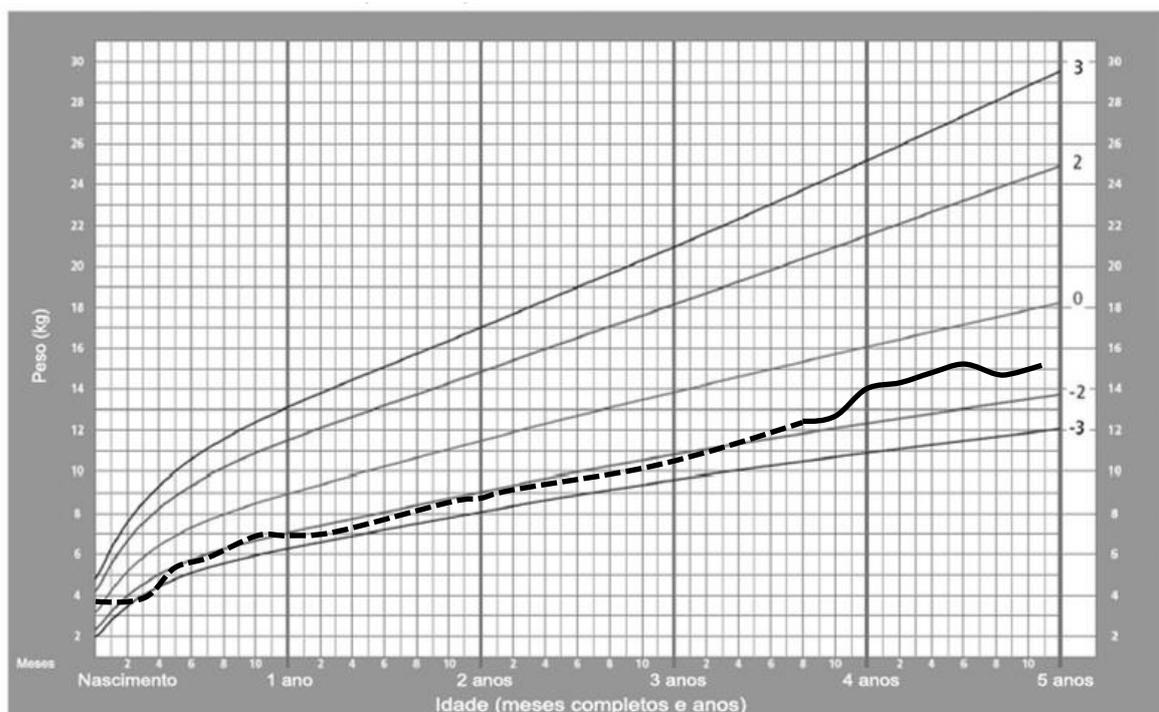


Figura 14: Paciente 4 – Peso/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

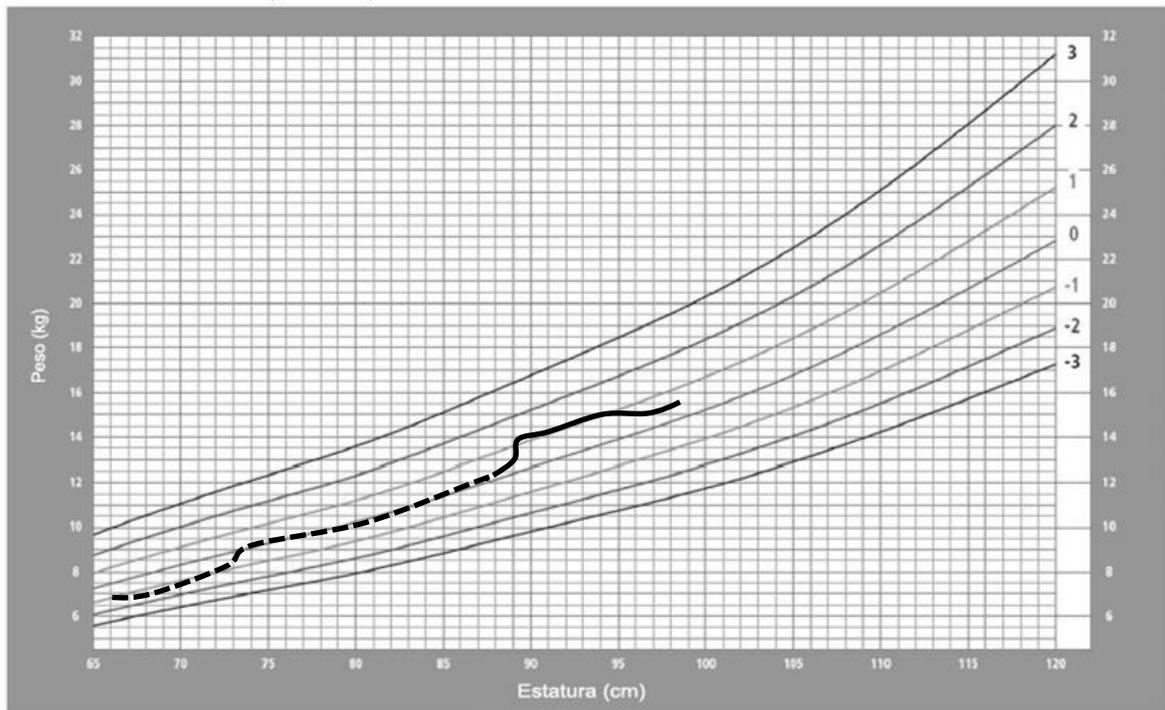


Figura 15: Paciente 4 – Peso/estatura: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

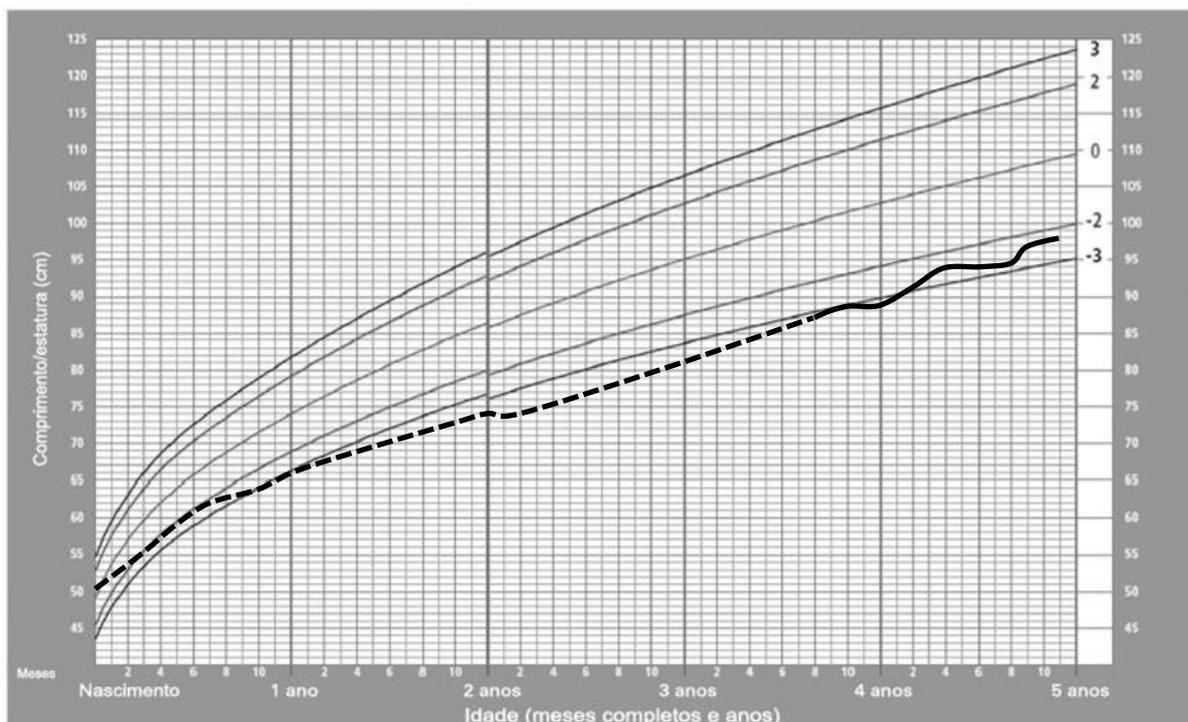


Figura 16: Paciente 4 – Estatura/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

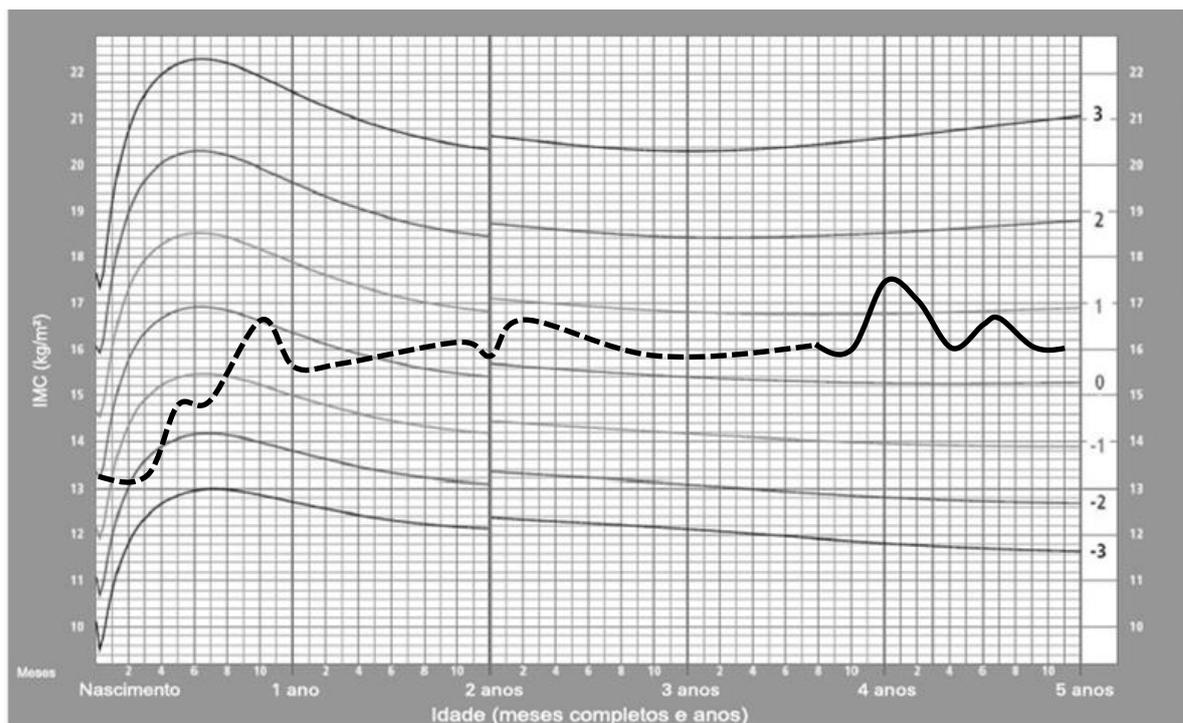


Figura 17: Paciente 4 – IMC/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

5.1.5 Paciente 5

Criança do sexo masculino, nascido em 02/10/2010, natural de Olhos d'Água (MG). Nasceu de parto normal, a termo, com peso, comprimento e perímetro cefálico adequados. É o 6º filho de casal jovem, sadio e não consanguíneo. Mãe nega abortos, teve um filho prematuro que faleceu no primeiro dia de vida, demais filhos hígidos. Criança teve alta com 48 horas de vida e manteve-se assintomático até o terceiro dia, quando iniciou hipoatividade, sucção débil, convulsões tipo mioclonia na face e odor adocicado na urina. Foi internado em Montes Claros (MG) por 28 dias, sem alterações evidentes na tomografia computadorizada. Voltou para casa onde ficou mais 2 meses, sempre hipoativo, sugando, mas engasgando muito. Foi novamente internado aos 6 meses de vida por dificuldade de deglutição e convulsões. Ficou em uso de sonda nasoentérica e foi levantada suspeita de doença neuromuscular por eletroneuromiografia. O diagnóstico de MSUD foi estabelecido através de cromatografia quantitativa de aminoácidos aos 7 meses de idade, sendo encaminhado para o HC-UFMG. Foi admitido com quadro de desnutrição grave, atraso importante do desenvolvimento neuropsicomotor, hipomímia facial e tórax deformado em

“peito de pombo”. A princípio foi introduzida dieta parenteral com restrição proteica e posteriormente fórmula metabólica especial por via enteral. Permaneceu internado até os 8 meses de idade e teve alta com dieta por via oral, com bom padrão de sucção, baixo peso e baixa estatura para a idade. Apresentou melhora da mímica facial e do aspecto do tórax. A tomografia computadorizada mostrou leve redução volumétrica encefálica.

Foi atendido no Ambulatório de EIM aos 10 meses de idade, com rápido aumento de peso, mas recuperação sutil do comprimento. Perímetro cefálico adequado, não tinha contato com o examinador, importante hipotonia axial, não sentava, apresentava clônus inesgotável nos membros inferiores, além de estrabismo convergente intermitente bilateral.

Com 1 ano e 2 meses foi liberada a oferta de alimentos sólidos por via oral em acompanhamento com equipe de fonoaudiologia, sempre com baixa aceitação. Aos 2 anos a criança tem peso adequado para a idade, estatura limítrofe (Fig. 18, 19, 20 e 21) e microcefalia importante. Evolui com atraso global do desenvolvimento neuropsicomotor, sem ganhos funcionais. Não tem sustento cefálico completo, não senta, não interage com o examinador, não agarra objetos, sorri e dá gargalhada. Tem estrabismo, clônus esgotável, hipertonia em membros inferiores e convulsões controladas com medicamento. Tem aceitação parcial à dieta e hábito intestinal constipado.

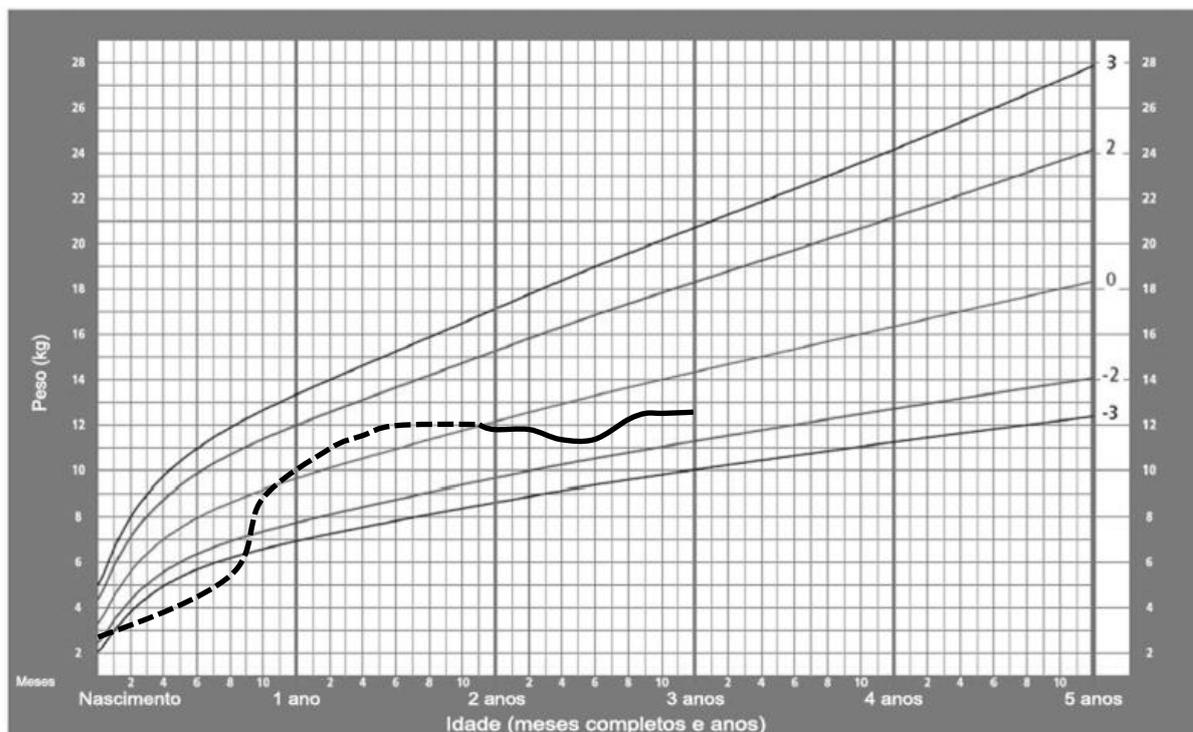


Figura 18: Paciente 5 – Peso/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

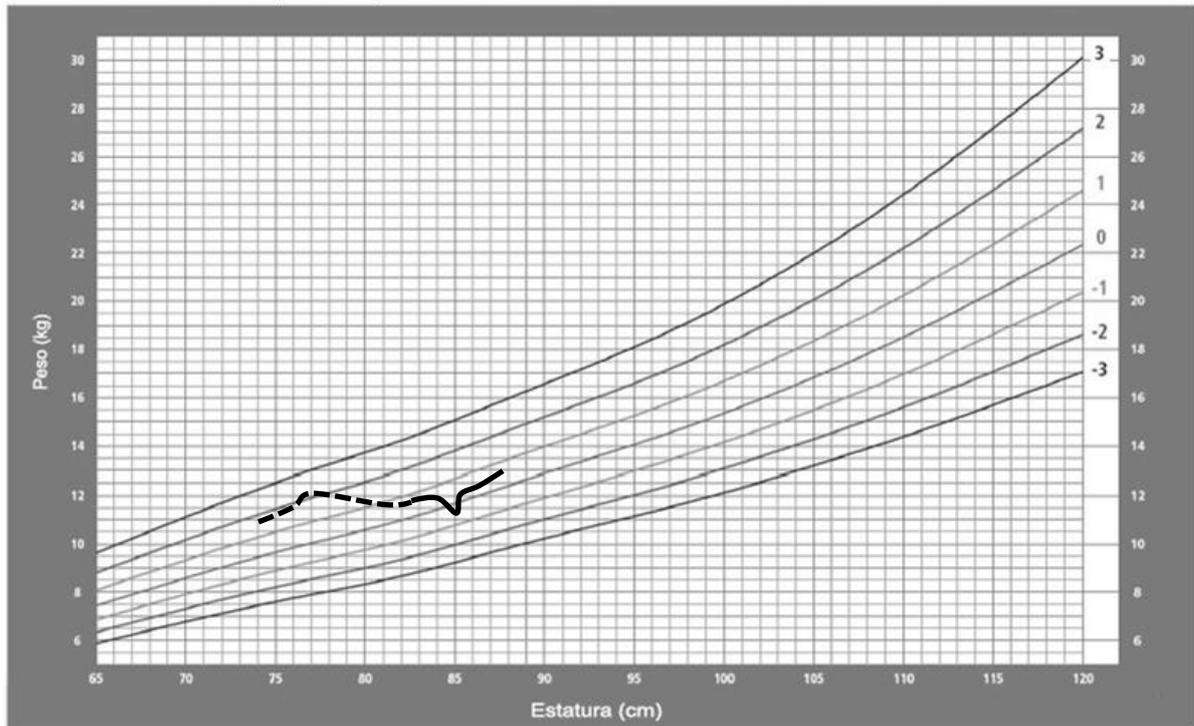


Figura 19: Paciente 5 – Peso/estatura: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

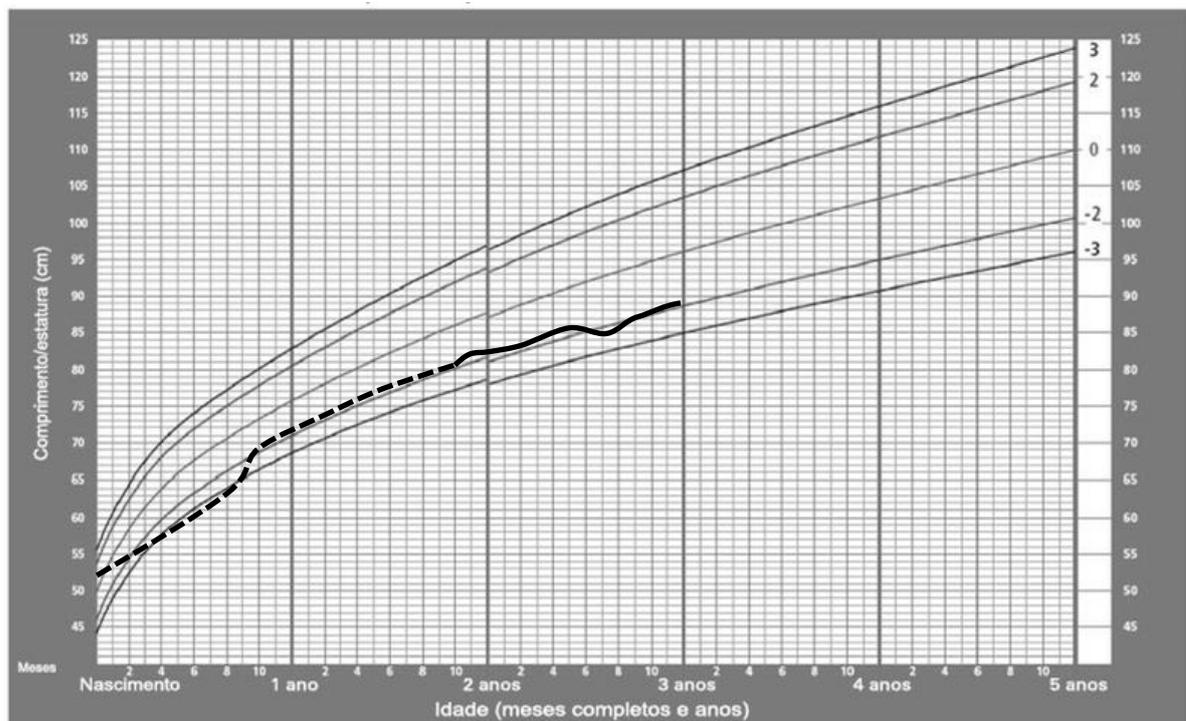


Figura 20: Paciente 5 – Estatura/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

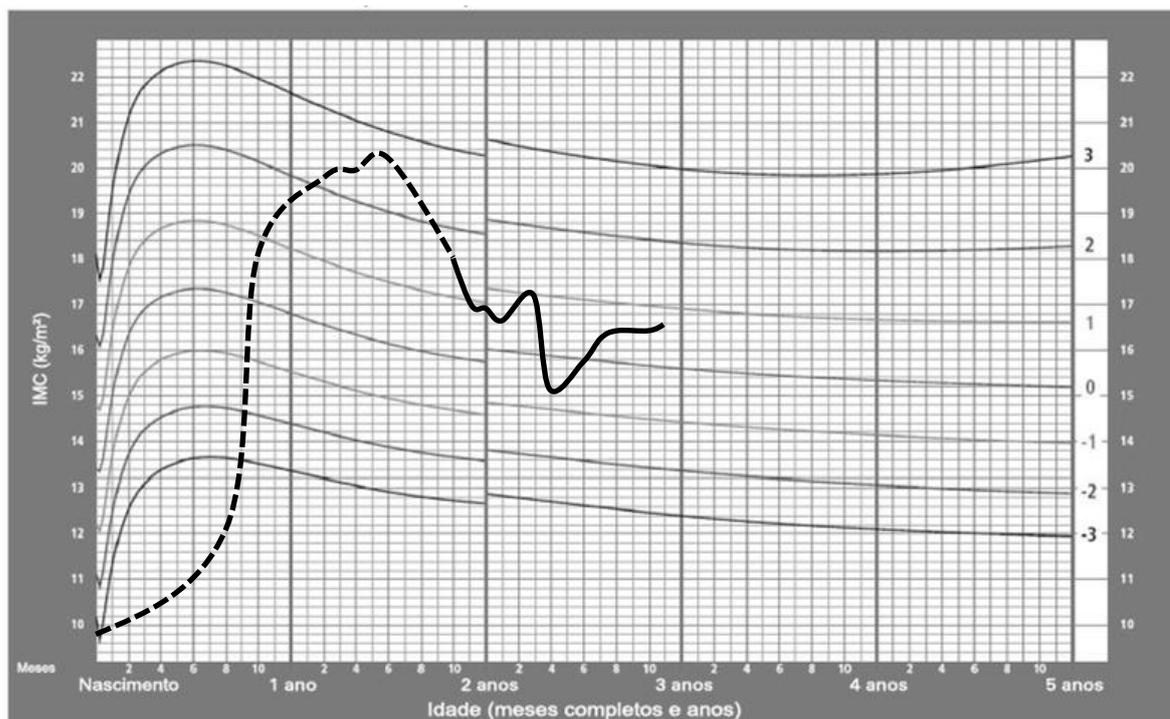


Figura 21: Paciente 5 – IMC/idade: A linha contínua representa as medições realizadas durante o estudo e a tracejada os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006

5.1.6 Paciente 6

Criança do sexo feminino, nascida em 01/02/2003, gravidez planejada e parto normal a termo. Segunda filha de casal consanguíneo, primos de 2º grau, natural de Belo Horizonte (MG). A primeira filha do casal, com história de atraso grave do desenvolvimento neuropsicomotor e inúmeras internações, teve diagnóstico de MSUD com 1 ano e 1 mês, mas não chegou a receber tratamento, falecendo dois meses depois. Às 50 horas de vida da segunda filha do casal foi realizada dosagem de aminoácidos que mostrou níveis de leucina mais de seis vezes acima do valor máximo de referência e também aumento de isoleucina e valina. O teste do DNPH na urina também se encontrava positivo, sendo diagnosticado MSUD. O aleitamento materno foi suspenso com 60 horas de vida e a dieta especial introduzida com 78 horas de vida. Criança permaneceu assintomática, apresentando apenas odor adocicado no vómito, e foi observada normalização dos exames já no quinto dia de vida. Não chegou a apresentar sintomas e manteve peso, comprimento e perímetro cefálico normais. Não houve resposta bioquímica adequada à suplementação de tiamina. Recebeu,

além de dieta especial, suplementação com os aminoácidos glutamina, alanina, glutamato, triptofano, isoleucina e valina.

Com 2 meses apresentou quadro de deficiência de aminoácidos caracterizado por sonolência, descamação e hiperemia nas virilhas e pernas, além de queda de cabelo, com melhora após ajuste da dieta. Atingiu todos os marcos de desenvolvimento neuropsicomotor, sentando sem apoio aos 6 meses e andando sem apoio, falando palavras e fazendo pinça fina com 1 ano e 2 meses.

Apresentou sua primeira crise de descompensação com 3 anos e 6 meses, durante amigdalite aguda. Na ocasião foi internada no CTI com distonia e coma por edema cerebral. Aos 4 anos e 3 meses foi internada devido a gastroenterite e consequente descompensação metabólica, sendo alimentada por sonda nasoentérica. Não apresentou distonia ou edema cerebral. Aos 5 anos iniciou escola regular, não sendo observada qualquer dificuldade escolar. Fazia uso de fórmula metabólica especial e suplementação de valina. Com 8 anos e 6 meses tinha crescimento (Fig. 22, 23 e 24) e desenvolvimento normais. Foi internada nesse período devido a episódio de descompensação metabólica grave por diarreia aguda, evoluindo para óbito. A dificuldade maior no controle desta crise foi a falta de disponibilidade de realização de dosagem de aminoácidos, sendo tratada de forma empírica.

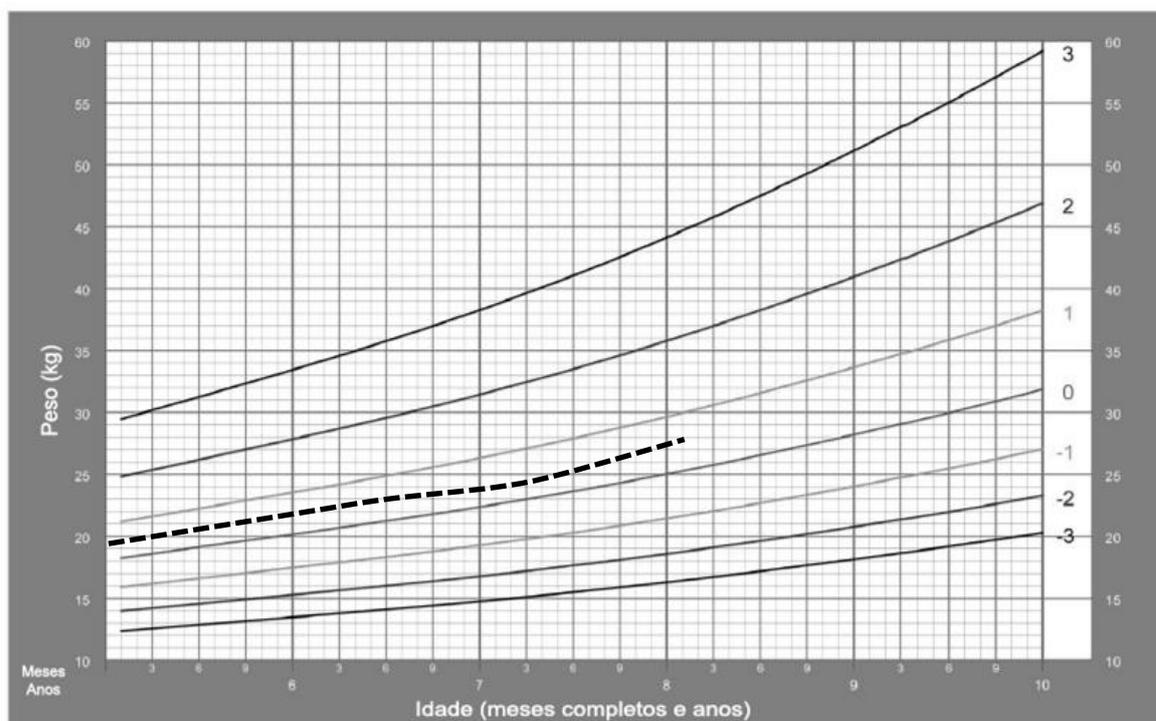


Figura 22: Paciente 6 – Peso/idade: A linha tracejada representa os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de DE ONIS et al. 2007

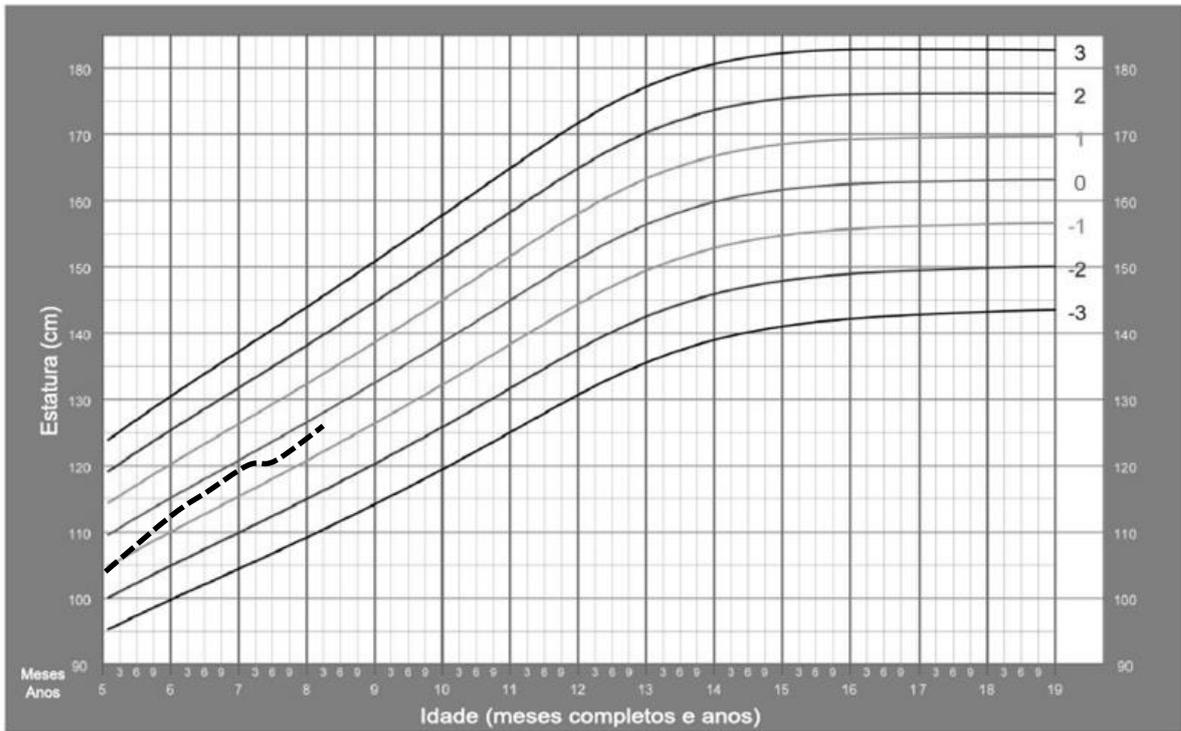


Figura 23: Paciente 6 – Estatura/idade: A linha tracejada representa os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de DE ONIS et al. 2007

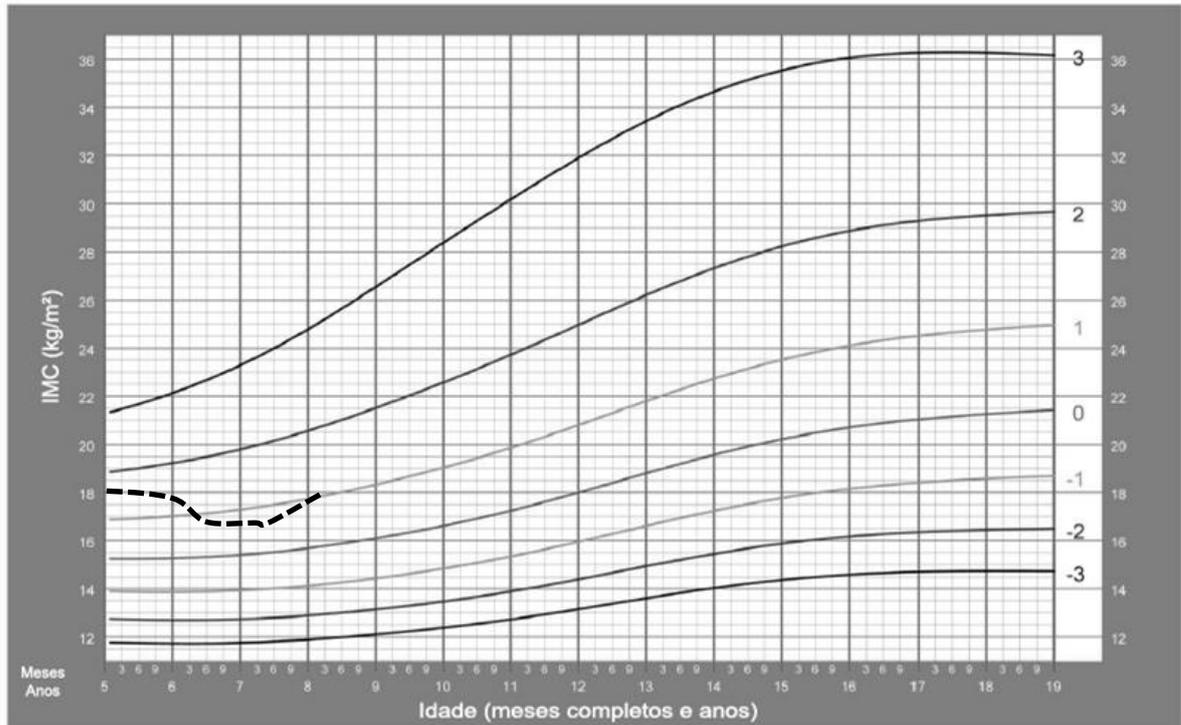


Figura 24: Paciente 6 – IMC/idade: A linha tracejada representa os dados retrospectivos coletados em prontuário.

Fonte: Adaptado de DE ONIS et al. 2007

5.1.7 Considerações gerais

O quadro 6 resume os dados de diagnóstico e evolução clínica dos seis pacientes com MSUD. Os dados levantados sobre os pacientes acompanhados em nosso serviço evidenciam um padrão clínico bastante claro: são crianças aparentemente híginas ao nascimento, sem intercorrências na gestação ou parto, que apresentam sintomas inespecíficos, porém semelhantes, com poucos dias de vida (mediana 6,0 dias; IQ 3,5 – 8,0), mas que tiveram diagnóstico tardio (mediana 36,5 dias; IQ 16,5 – 97,5). Em descrição da população brasileira de crianças com MSUD, Herber (2012) encontrou mediana de 10,0 dias para início dos sintomas (IQ 5,0 – 30,0) e mediana de 60,0 dias para idade ao diagnóstico (IQ 29,0 – 240,0).

A idade no momento do diagnóstico se relacionou diretamente com a evolução clínica, crescimento e desenvolvimento. Em nossa amostra, apenas uma criança teve diagnóstico e tratamento estabelecidos dentro do prazo de 10 dias, limite preconizado na literatura (KAPLAN et al., 1991; NORD, VAN DOORNINCK e GREENE, 1991; SNYDERMAN, 1988), sendo a única a apresentar desenvolvimento neuropsicomotor normal. Entre os demais pacientes, aqueles diagnosticados até os 2 meses de idade apresentaram melhores padrões de crescimento e desenvolvimento neuropsicomotor, em relação àqueles diagnosticados após esse período.

Os dados obtidos sugerem que o atraso do diagnóstico é o ponto crítico da evolução de pacientes com MSUD, mas que mesmo o diagnóstico precoce não é capaz de garantir o sucesso clínico. O caso da Paciente 6 dá evidências da fragilidade do controle metabólico e da complexidade do tratamento dessas crianças, que contribuem para que seu prognóstico seja incerto.

Quadro 6 – Resumo do diagnóstico e evolução clínica dos pacientes com MSUD

Paciente	1 ^b	2	3	4 ^b	5	6 ^b
Idade do início dos sintomas	9 dias	6 dias	4 dias	7 dias	3 dias	Sem sintomas
Idade ao diagnóstico	4 meses	1 mês e 20 dias	23 dias	3 meses	7 meses	2 dias
Sintomas principais ao diagnóstico	Vômitos, odor atípico, hipoatividade, sucção débil, hipoglicemia, acidose, choro fraco, hiperreflexia	Vômitos, prostração, hipoatividade, fezes amolecidas, sucção débil, convulsões, apneia, clônus, nistagmo horizontal	Opistótono, movimentos de pedalar, prostração, sucção débil, hipoglicemia, convulsões, apneia	Sonolência, fontanela tensa, sucção débil, hipoatividade	Hipoatividade, sucção débil, convulsões, odor adocicado na urina	Sem sintomas
Idade atual	14 anos	8 anos	4 anos	4 anos	2 anos	-
Antropometria^a	Baixo peso e estatura limítrofe para a idade	Peso e estatura adequados para a idade	Peso e estatura adequados para a idade	Peso adequado e baixa estatura para a idade	Peso adequado e estatura limítrofe para a idade	Peso e estatura adequados para a idade
Perímetro cefálico^a	Microcefalia (PC = 51 cm)	Normal	Normal	Normal	Microcefalia (PC = 45 cm)	Normal
Desenvolvimento	Contato social pobre, senta sem apoio, não anda, não segura objetos, vocaliza, não forma palavras, deglutição normal, não controla esfíncteres.	Anda com apoio, verbaliza com dificuldade, conhece as letras, escreve o próprio nome, estrabismo, deglutição normal, controle de esfíncteres.	Frequente escola regular, conta histórias, anda sozinha usando tutor, deglutição normal, estrabismo leve, controle adequado de esfíncteres.	Senta sem apoio, troca passos com apoio, não forma palavras, reconhece pessoas, estrabismo, aponta partes do corpo, não controla esfíncteres.	Não tem sustento cefálico completo, não senta, não interage, estrabismo e clônus esgotável, deglutição normal, não controla esfíncteres.	Normal

^a Segundo aferições realizadas durante o andamento do estudo.

^b Filho de pais consanguíneos.

5.2 Análise de aminoácidos

5.2.1 Técnica analítica

A técnica de análise de aminoácidos por HPLC resultou na adequada separação de 15 dos 17 analitos. Os aminoácidos treonina e glicina, no entanto, não puderam ser completamente separados, sendo obtida apenas a quantificação de seu somatório. A baixa resolução de alguns analitos é comum na análise de aminoácidos, justamente por se tratarem de múltiplos compostos, com propriedades químicas e tempos de retenção muito próximos. Mudanças nos parâmetros analíticos, como temperatura, pH de soluções tampão e gradiente, podem ser instituídas para otimizar a separação desses pares, porém a resolução de outros aminoácidos tende a ser prejudicada (ARMSTRONG, JONSCHER e REISDORPH, 2007; LIU et al., 1998; REVERTER, LUNDH e LINDBERG, 1997). Algumas vezes, a realização de duas corridas utilizando técnicas diferentes é necessária para a separação e quantificação de todos os aminoácidos de interesse. As figuras abaixo representam o perfil obtido na quantificação dos aminoácidos em solução padrão (Fig. 25) e em plasma (Fig. 26).

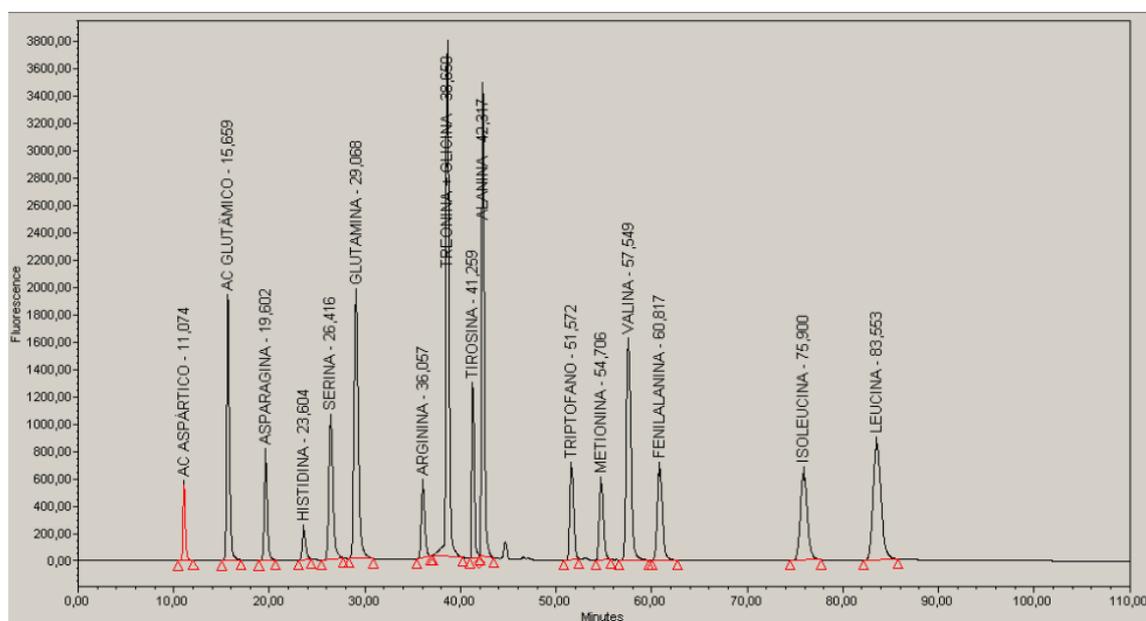


Figura 25: Perfil cromatográfico na quantificação dos aminoácidos em solução. Os picos estão identificados segundo o aminoácido e seu respectivo tempo de retenção.

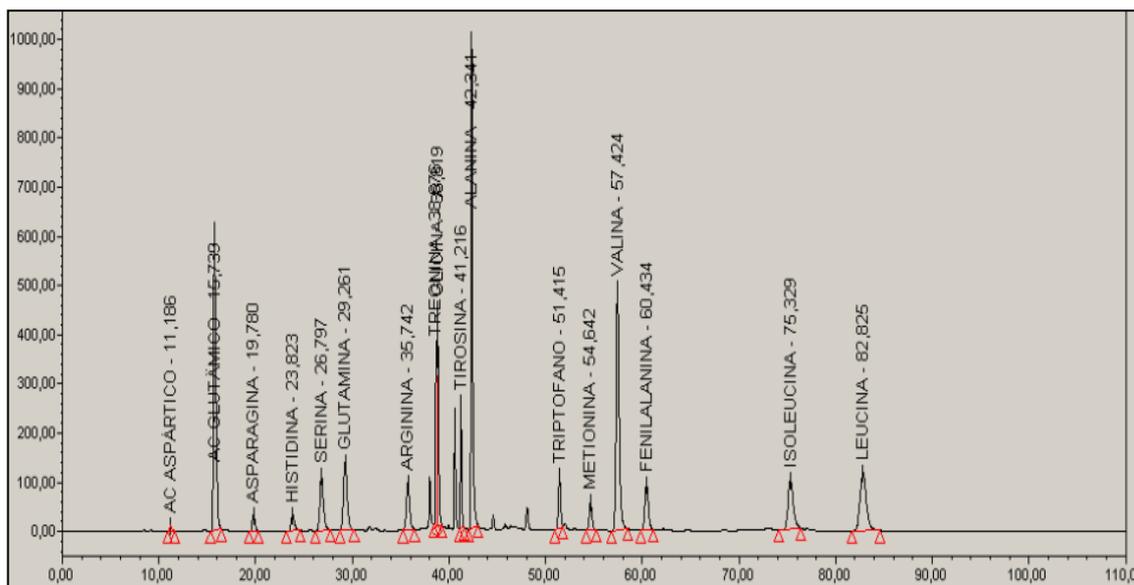


Figura 26: Perfil cromatográfico na quantificação dos aminoácidos em plasma de indivíduo do grupo controle. Os picos estão identificados segundo o aminoácido e seu respectivo tempo de retenção.

Durante a realização das análises observou-se a presença de um pico adicional entre os aminoácidos isoleucina e leucina no plasma dos pacientes com MSUD, em relação ao plasma de indivíduos do grupo controle (Fig. 27). A identificação desse pico como sendo de aloisoleucina se deu por meio de adição do padrão desse aminoácido à solução.

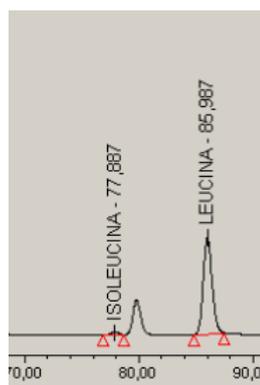


Figura 27: Detalhe da presença de pico adicional de aloisoleucina no perfil cromatográfico de pacientes com MSUD. Os picos estão identificados segundo aminoácido e seu respectivo tempo de retenção.

Como citado anteriormente, a presença da aloisoleucina em quantidades significativas no plasma é patognomônica para o diagnóstico de MSUD. Estima-se que,

enquanto a aloisoleucina pode ser detectada em 99% e 90% das amostras de indivíduos com a forma clássica e variante, o aumento concomitante de todos os AACR ocorra em apenas 2% e 3%, respectivamente, dessas amostras. Esses dados demonstram a importância da utilização de técnicas de análise capazes de detectar a aloisoleucina, uma vez que há aumento significativo da sensibilidade do diagnóstico. As concentrações séricas de aloisoleucina e isoleucina, seu precursor, parecem estar relacionadas, mas mais estudos são necessários para estabelecer sua relação com a gravidade da doença e sua importância no controle metabólico (SCHADEWALDT et al., 1999).

5.2.2 Intervalos de referência

Sabe-se que a idade pode ser um fator de influência na concentração sérica de aminoácidos, no entanto esse efeito é mais acentuado em crianças menores de um ano e, em especial, no primeiro mês de vida (BREMER et al., 1981, SHIH, 1993). Para averiguar a influência dessa variável no grupo estudado, os dados foram escalonados para as faixas etárias de 2 a 7 anos e de 8 a 14 anos, de acordo com estratificações descritas na literatura (GREGORY et al., 1986; LEPAGE et al., 1997). Não houve diferença significativa entre os valores médios obtidos para a grande maioria dos aminoácidos, o que justifica a manutenção dos indivíduos em um único grupo. Ressalta-se, ainda, que outros estudos trabalham com faixas de idade semelhantes, sendo o mais clássico o descrito por Shapira e colaboradores (1989), que estabeleceu um único intervalo para indivíduos entre 2 e 18 anos e é amplamente adotado como referência para laboratórios. Também não foram observadas diferenças significativas para a grande maioria dos aminoácidos entre sexo masculino e feminino, o que é condizente com a literatura, para a faixa etária estudada (GREGORY et al., 1986).

Alguns autores consideram que a coleta de sangue para dosagem de aminoácidos deve ser feita preferencialmente pela manhã, após jejum (SHIH, 2003). A padronização dessas condições, portanto, foi aplicada principalmente como forma de reduzir possíveis variações entre a coleta realizada para grupo caso e controle. Diversos laboratórios, no entanto, dispensam a realização de jejum para a dosagem quantitativa de aminoácidos uma vez que essa indicação não é absoluta e dados da literatura demonstram uma grande homeostase na concentração de aminoácidos em jejum e no estado alimentado (SCRIVER et al., 1985). Esses dados sugerem que, provavelmente, resultados semelhantes poderiam ter sido obtidos mesmo sem a padronização dessa condição de coleta.

Para amostras de $40 \leq n < 120$ o CLSI recomenda a utilização do método paramétrico ($\pm 1,96$ DP) de definição de intervalos de referência para dados com distribuição normal e do método não paramétrico (P2,5 e P97,5) para dados com distribuição não normal. A utilização do método robusto é também fortemente recomendada para esse tamanho amostral, uma vez que exige apenas a distribuição simétrica, mas não necessariamente gaussiana dos dados. Essa metodologia consiste na utilização de estatísticas robustas (mediana e desvio absoluto mediano) e é menos sensível à presença de *outliers* (HORN, PESCE e COPELAND, 1998). Quando a simetria não é observada nos dados brutos, recomenda-se que esses sejam submetidos à transformação de Box-Cox antes do cálculo pelo método robusto. Outra vantagem desse método é que ele permite o cálculo preciso do intervalo de confiança de 90% para os limites inferior e superior, o que não ocorre com o método de percentis para $n < 120$ (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008; GEFFRÉ et al., 2011).

As tabelas 3, 4, 5 e 6 trazem os intervalos de referência calculados para todos os aminoácidos séricos e seu influxo cerebral. As três metodologias de cálculo de intervalo de normalidade recomendadas encontram-se descritas, embora, nesse trabalho, tenha-se optado pela adoção dos valores obtidos pelos métodos de escores e percentis. Essas metodologias permitem uma melhor comparação com a literatura, além de possibilitarem a classificação dos resultados de exames dos pacientes com MSUD. Os resultados de aminoácidos séricos estão apresentados em nmol/mL e de influxo cerebral em nmol/min/g de tecido cerebral.

A utilização do método de Reed para a identificação de *outliers* resultou em um único valor suspeito para o aminoácido histidina no plasma. O CLSI recomenda que, a menos que se trate de uma observação clinicamente aberrante, deve-se dar ênfase em manter o resultado na amostra e, por isso, esse dado não foi excluído na análise.

Como citado anteriormente, não foi possível a separação completa de treonina e glicina e, assim, o intervalo de normalidade obtido representa o somatório desses aminoácidos. Para o cálculo de influxo cerebral foi utilizado um valor médio de treonina sérica (120 nmol/mL) descrito na literatura (STRAUSS et al., 2010), tanto para indivíduos do grupo controle, quanto do grupo caso. Por sua baixa afinidade com o transportador LAT1 e baixa concentração no sangue, quando comparada aos demais aminoácidos, a treonina possui o menor valor de influxo cerebral, além de pequena influência no influxo dos demais aminoácidos. Essa extrapolação, portanto, impossibilitou a análise do influxo cerebral de treonina, mas foi capaz de viabilizar a estimativa do influxo dos demais aminoácidos, com o menor erro possível dentro das limitações do método.

Foi realizada uma análise de diversos intervalos de referência descritos na literatura (LEPAGE et al., 1997; SHAPIRA et al., 1989; STRAUSS et al., 2010) e observou-se que, quando treonina e glicina são adequadamente separadas, o valor central de treonina corresponde a aproximadamente 30% da soma dos dois aminoácidos. Aplicando essa proporção à média do somatório de treonina e glicina observada em nosso estudo obtém-se um valor médio de 118 nmol/mL, sugerindo que os dados encontrados em nossa população devem, de fato, ser semelhantes à média descrita por Strauss e colaboradores.

Tabela 3 – Intervalos de referência para os aminoácidos séricos (distribuição normal)

Aminoácidos	Intervalos de referência (n = 60)					
	Média	DP	Método paramétrico ^a		Método robusto	
Limite inf. (IC 90%)			Limite sup. (IC 90%)	Limite inf. (IC 90%)	Limite sup. (IC 90%)	
Asparagina^b	57	19	20 (13 - 27)	94 (88 - 102)	25 (22 - 29)	100 (92 - 110)
Serina	111	27	58 (48 - 68)	164 (155 - 175)	56 (47 - 65)	166 (155 - 175)
Histidina	100	29	43 (32 - 53)	157 (146 - 168)	38 (26 - 50)	158 (144 - 170)
Arginina	82	23	37 (29 - 56)	127 (119 - 136)	35 (28 - 43)	129 (120 - 137)
Tirosina	72	18	37 (30 - 43)	107 (100 - 114)	32 (25 - 38)	106 (97 - 114)
Triptofano	61	17	28 (22 - 34)	94 (87 - 100)	25 (18 - 34)	93 (85 - 100)
Metionina	22	5	12 (11 - 15)	32 (29 - 33)	13 (11 - 15)	31 (29 - 33)
Valina	204	38	129 (114 - 143)	279 (265 - 293)	125 (112 - 140)	280 (265 - 295)
Fenilalanina	58	10	38 (34 - 42)	78 (74 - 82)	36 (32 - 40)	78 (73 - 82)
Isoleucina	57	11	35 (32 - 40)	79 (74 - 82)	35 (32 - 39)	79 (75 - 83)
Treonina +Glicina	395	112	175 (135 - 218)	615 (573 - 656)	154 (112 - 197)	607 (558 - 656)

^a Média \pm 1,96 DP

^b Intervalo pelo método robusto calculado após transformação de Box-Cox

Tabela 4 – Intervalos de referência para os aminoácidos séricos (distribuição não normal)

Aminoácidos	Intervalos de referência (n = 60)						
	Método não paramétrico ^{a,b}					Método robusto	
	Mediana	Mín.	Máx.	Limite inf.	Limite sup.	Limite inf. (IC 90%)	Limite sup. (IC 90%)
Aspartato^c	8	4	31	4	30	4 (4 - 5)	22 (18 - 27)
Glutamato^c	134	48	299	53	289	48 (41 - 58)	302 (270 - 334)
Glutamina^d	627	335	1415	367	1365	-	-
Alanina	311	166	586	170	581	100 (68 - 136)	544 (490 - 589)
Leucina^c	113	80	177	85	168	81 (78 - 85)	170 (157 - 182)

^a Percentis 2,5 e 97,5

^b Não foi possível calcular o IC 90%, pois n < 120

^c Intervalo pelo método robusto calculado após transformação de Box-Cox

^d Intervalo não calculado pelo método robusto, pois não houve distribuição simétrica com transformação Box-Cox

Tabela 5 – Intervalos de referência de influxo cerebral de aminoácidos (distribuição normal)

Aminoácidos	Intervalos de referência (n = 60)					
	Método paramétrico ^a				Método robusto	
	Média	DP	Limite inf. (IC 90%)	Limite sup. (IC 90%)	Limite inf. (IC 90%)	Limite sup. (IC 90%)
Histidina	2,98	0,68	1,65 (1,40 - 1,90)	4,31 (4,05 - 4,55)	1,58 (1,32 - 1,86)	4,31 (4,03 - 4,57)
Tirosina	5,24	0,78	3,71 (3,43 - 4,01)	6,77 (6,48 - 7,05)	3,62 (3,35 - 3,89)	6,78 (6,46 - 7,06)
Triptofano	10,84	1,82	7,27 (6,61 - 7,95)	14,41 (13,73 - 15,07)	6,90 (6,09 - 7,80)	14,40 (13,41 - 15,17)
Metionina	0,68	0,11	0,46 (0,42 - 0,50)	0,90 (0,85 - 0,93)	0,46 (0,42 - 0,50)	0,91 (0,86 - 0,94)
Valina	2,33	0,26	1,82 (1,73 - 1,92)	2,84 (2,74 - 2,93)	1,80 (1,71 - 1,89)	2,85 (2,73 - 2,95)
Fenilalanina	10,62	0,97	8,72 (8,36 - 9,08)	12,52 (12,16 - 12,88)	8,48 (8,02 - 8,97)	12,48 (11,95 - 12,92)
Isoleucina	3,01	0,35	2,32 (2,21 - 2,46)	3,70 (3,56 - 3,81)	2,29 (2,17 - 2,41)	3,69 (3,53 - 3,83)

^a Média ± 1,96 DP

Tabela 6 – Intervalos de referência de influxo cerebral de aminoácidos (distribuição não normal)

Aminoácidos	Intervalos de referência (n = 60)						
	Método não paramétrico ^{a,b}					Método robusto	
	Mediana	Mín.	Máx.	Limite inf.	Limite sup.	Limite inf. (IC 90%)	Limite sup. (IC 90%)
Glutamina	1,63	0,85	3,58	0,87	3,36	0,38 (0,09 - 0,61)	2,96 (2,65 - 3,24)
Leucina	11,44	8,89	14,58	9,17	14,53	8,84 (8,44 - 9,30)	14,16 (13,57 - 14,71)

^a Percentis 2,5 e 97,5

^b Não foi possível calcular o IC 90%, pois n < 120

É possível observar que os intervalos de referência obtidos por diferentes métodos estatísticos foram, na maior parte dos casos, muito semelhantes. As maiores diferenças foram percebidas para alanina sérica e influxo cerebral de glutamina, provavelmente devido a maior assimetria dos dados. Ainda assim, a utilização de ambos os intervalos é possível, uma vez que estão de acordo com os padrões estatísticos recomendados.

Os dados obtidos foram comparados com os valores de grupo controle publicados por Strauss e colaboradores (2010). Neste trabalho os autores utilizaram um grupo de 51 crianças menonitas saudáveis para o estabelecimento de intervalos de referência e acompanhamento de crianças com MSUD. O estudo foi escolhido para comparação, pois, apesar de ter sido conduzido em uma população bastante diferente, utilizou técnica analítica e tamanho amostral semelhantes. Além disso, é um dos poucos trabalhos a descrever tanto valores de referência séricos, quanto para influxo cerebral dos dez aminoácidos transportados por LAT1. Houve diferença estatisticamente significativa para quase todos os aminoácidos analisados, podendo-se afirmar que existem variações substanciais na concentração sérica e no influxo cerebral de aminoácidos entre os grupos.

Segundo Shih (2003), os valores séricos de aminoácidos podem sofrer variações importantes entre laboratórios, mesmo quando instrumentos de análise semelhantes são utilizados e, por isso, é comum o estabelecimento de intervalos de referência próprios de cada laboratório. Esse cuidado resulta em exames com maior confiabilidade e na eliminação de vieses que poderiam interferir na análise dos resultados da pesquisa clínica. Se tal estudo não for possível podem ser utilizadas técnicas de revalidação de intervalos de referência de outros laboratórios, com maior atenção na interpretação dos resultados (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008).

5.2.3 Resultados das dosagens de aminoácidos e influxo cerebral dos pacientes

5.2.3.1 Paciente 1

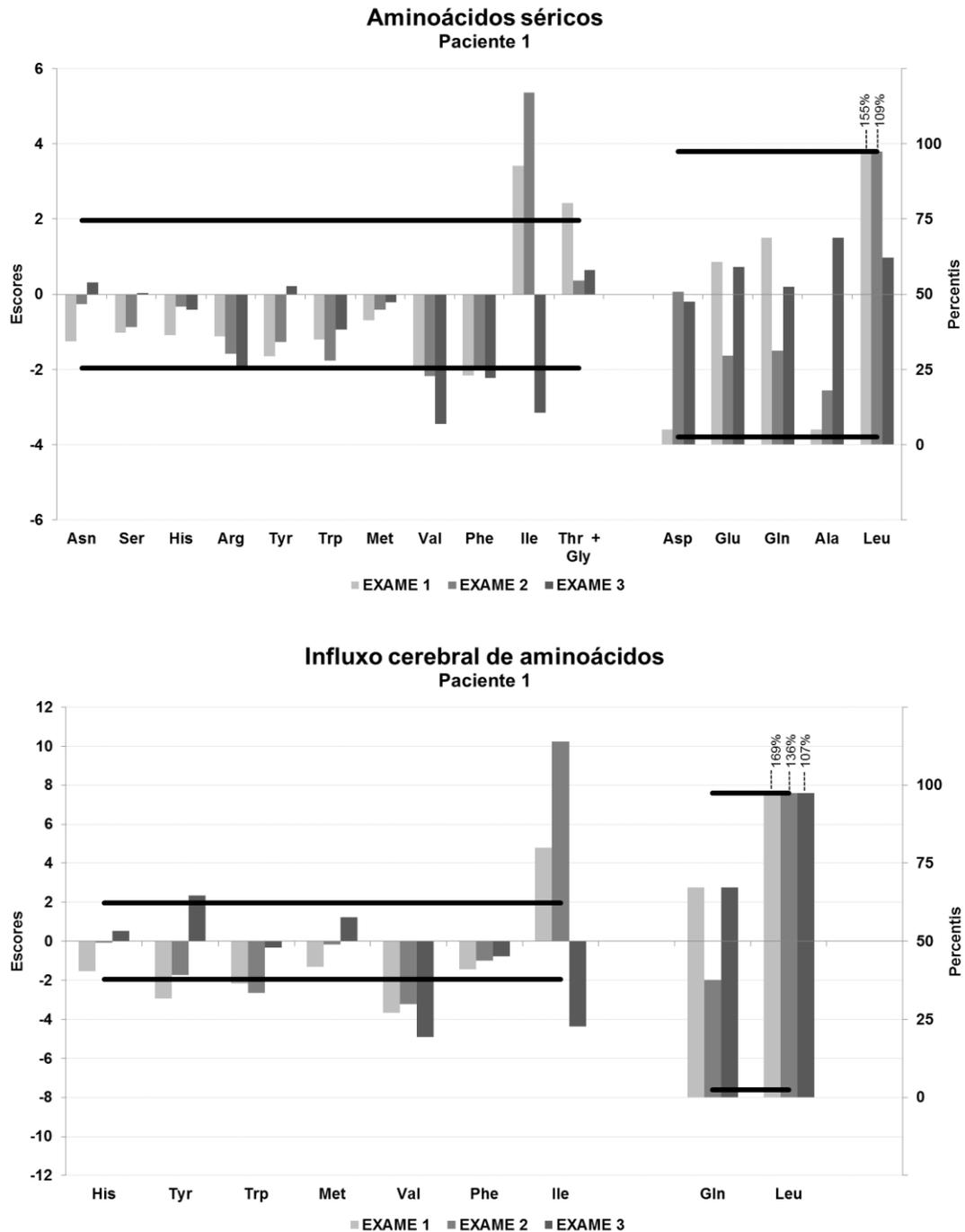


Figura 28: Resultados das dosagens de aminoácidos no plasma e influxo cerebral de aminoácidos do Paciente 1. As barras horizontais representam o intervalo de normalidade segundo método paramétrico (eixo da esquerda) e método não paramétrico (eixo da direita). O eixo horizontal central indica o valor médio para os dados (média ou mediana). Os percentuais localizados acima das barras no gráfico de percentis indicam quanto o valor observado no exame do paciente representa do P97,5 do intervalo de referência.

Durante o período em que foram realizados os exames a criança encontrava-se clinicamente estável, com bom estado geral. Observa-se que apenas os AACR, treonina + glicina e fenilalanina apresentaram desvio do intervalo de normalidade nas dosagens séricas (Fig. 28). Ainda assim, é possível perceber uma tendência de quase todos os aminoácidos manterem-se abaixo do valor central dos controles, ocupando a porção inferior do gráfico, ainda que dentro do intervalo de referência. Em nenhum exame foi obtida normalização das concentrações séricas de todos os AACR. Observa-se decréscimo da concentração de leucina, que foi acompanhado de redução acentuada dos valores de isoleucina e valina, levando à deficiência desses aminoácidos no último exame.

A estimativa do influxo cerebral de aminoácidos evidencia aumento da entrada de leucina em todas as dosagens. No último exame há normalização do valor sérico desse aminoácido, mas seu influxo permanece aumentado devido às baixas concentrações dos competidores, principalmente isoleucina e valina. Apesar de estarem em níveis séricos normais, houve influxo inadequado de tirosina e triptofano. Os dados de ingestão alimentar no dia anterior à realização de cada dosagem de aminoácidos estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 – Recomendações dietéticas e estimativa de ingestão de energia e nutrientes
(Paciente 1)

	Energia (Kcal/dia)	Proteína^a (g/dia)	Leucina (mg/dia)	Isoleucina (mg/dia)	Valina (mg/dia)
Recomendação^b	2200	≥ 55	540 - 720	325 - 435	375 - 505
1	2066	56	1372	780	1017
2	2200	57	1418	803	1049
3	2315	59	1586	889	1169

^a Proteína total, fornecida pela dieta e fórmula metabólica especial isenta de AACR.

^b Fonte: ACOSTA e YANNICELLI, 2001.

Observa-se que o paciente apresentou adequada ingestão calórica e proteica, porém com consumo de AACR bastante superior à recomendação para a idade. Ainda assim, foram observados níveis séricos decrescentes desses aminoácidos. Esse achado pode ser explicado pelo importante ganho pômdero-estatural observado no período, que leva à necessidade aumentada de aminoácidos para anabolismo muscular (STRAUSS et al., 2010). A intervenção dietética se baseou no aumento da oferta de proteína natural na tentativa de normalizar o aporte desses aminoácidos e evitar restrições ao crescimento.

5.2.3.2 Paciente 2

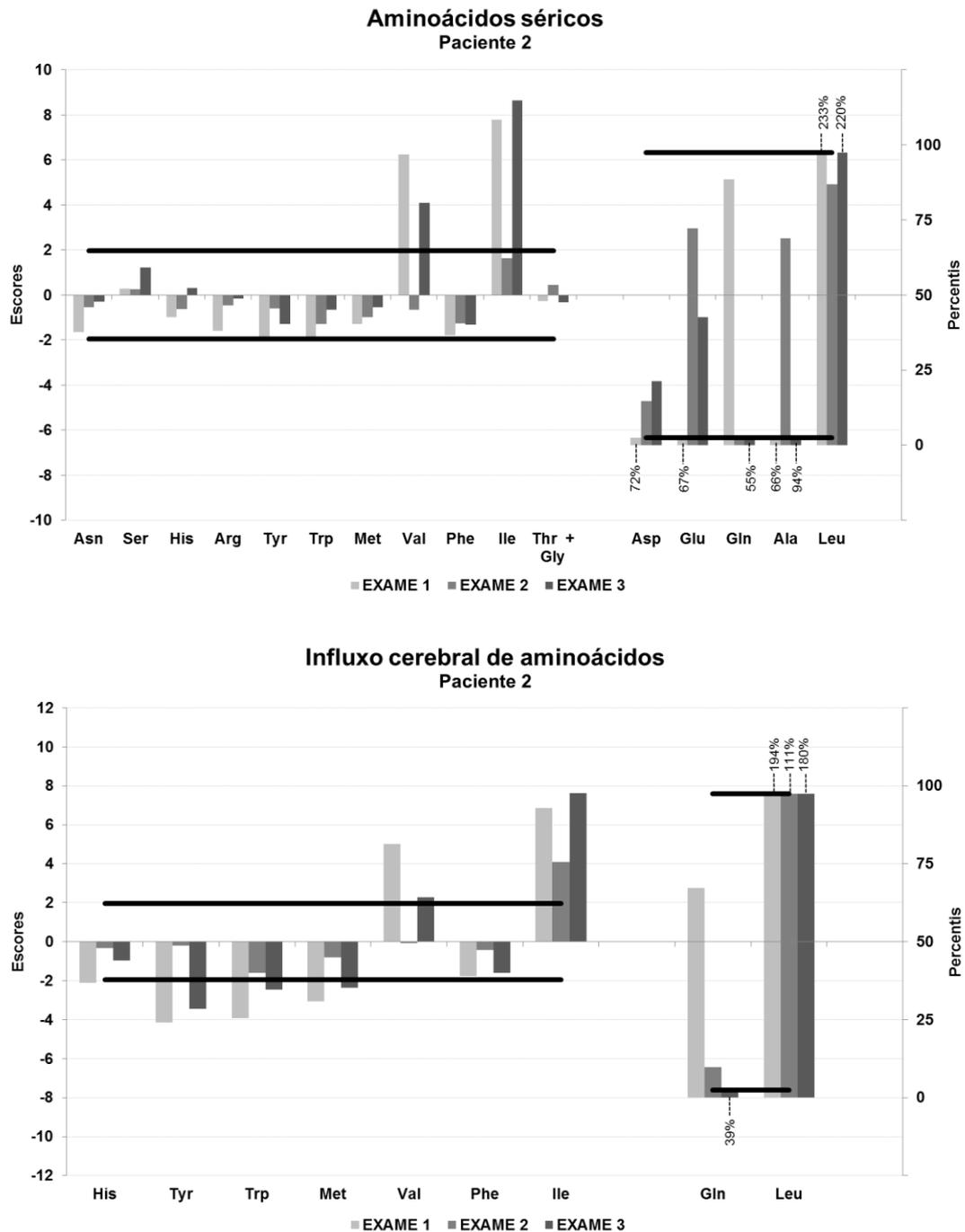


Figura 29: Resultados das dosagens de aminoácidos no plasma e influxo cerebral de aminoácidos do Paciente 2. As barras horizontais representam o intervalo de normalidade segundo método paramétrico (eixo da esquerda) e método não paramétrico (eixo da direita). O eixo horizontal central indica o valor médio para os dados (média ou mediana). Os percentuais localizados abaixo e acima das barras no gráfico de percentis indicam, respectivamente, quanto o valor observado no exame do paciente representa do P2,5 e do P97,5 do intervalo de referência.

A tendência dos aminoácidos estarem abaixo do valor médio do controle é também observada nos exames do Paciente 2, com exceção dos AACR e da serina (Fig. 29). Os aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina e alanina encontraram-se, inclusive, abaixo do limite inferior de normalidade em alguns exames. No exame 2 foi obtida a normalização das concentrações séricas de todos os aminoácidos, mas ainda assim manteve-se o influxo aumentado de leucina e isoleucina, sugerindo níveis insuficientes de seus competidores.

O estado clínico da criança era estável durante o período de realização das dosagens. Na tabela 8 encontram-se os dados de ingestão dietética dos nutrientes de interesse estimados na véspera de cada uma das dosagens de aminoácidos.

Tabela 8 – Recomendações dietéticas e estimativa de ingestão de energia e nutrientes
(Paciente 2)

	Energia (Kcal/dia)	Proteína^a (g/dia)	Leucina (mg/dia)	Isoleucina (mg/dia)	Valina (mg/dia)
Recomendação^c	2400	≥40	410 - 785	245 - 470	258 - 550
1	985	36	505	288	380 + 100 ^b
2	1581	39	615	439	542 + 50
3	1346	38	588	401 + 50	511 + 50

^a Proteína total, fornecida pela dieta e fórmula metabólica especial isenta de AACR.

^b Os somatórios representam a quantidade do aminoácido obtido pela dieta e a fornecida por suplementação.

^c Fonte: ACOSTA e YANNICELLI, 2001.

Observa-se baixo aporte energético em todos os momentos, que se refletiu em baixo ganho de peso no período, ainda que a criança tenha mantido estado nutricional adequado. O consumo de AACR esteve dentro da recomendação estipulada, mas, ainda assim, não foi observado controle de seus níveis no plasma. A criança já usava suplementação de valina ao início do estudo (100 mg/dia), que foi reduzida devido ao seu valor sérico muito aumentado no primeiro exame. Diante da queda acentuada da concentração de isoleucina no segundo exame iniciou-se, também, a suplementação desse aminoácido, na quantidade de 50 mg/dia. No último exame, no entanto, são observados valores muito aumentados de todos os AACR. A orientação dietética foi de reduzir o aporte de proteína natural da dieta, de forma a promover o decréscimo da concentração de leucina e manter a suplementação de isoleucina e valina, para evitar a deficiência desses aminoácidos.

5.2.3.3 Paciente 3

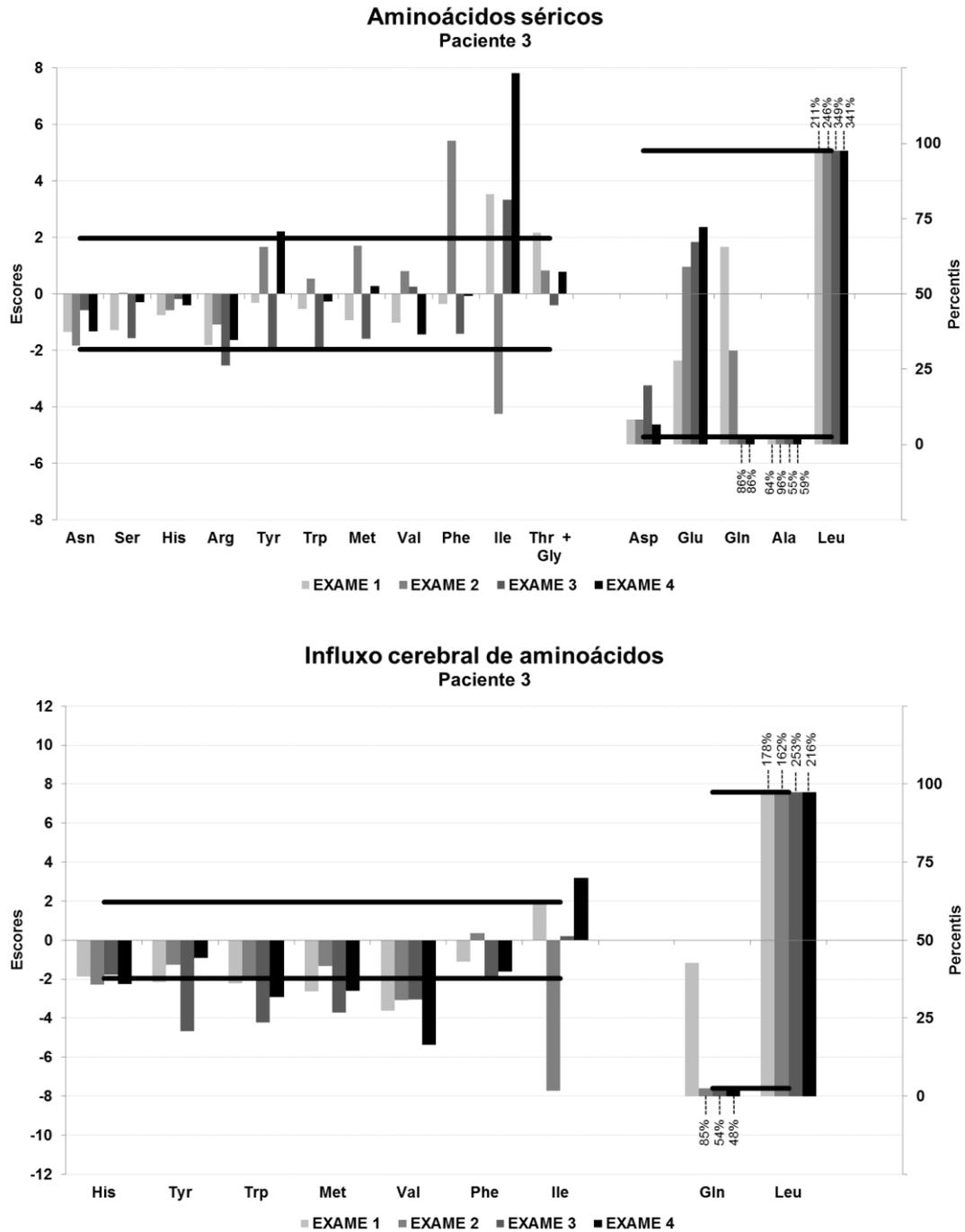


Figura 30: Resultados das dosagens de aminoácidos no plasma e influxo cerebral de aminoácidos do Paciente 3. As barras horizontais representam o intervalo de normalidade segundo método paramétrico (eixo da esquerda) e método não paramétrico (eixo da direita). O eixo horizontal central indica o valor médio para os dados (média ou mediana). Os percentuais localizados abaixo e acima das barras no gráfico de percentis indicam, respectivamente, quanto o valor observado no exame do paciente representa do P2,5 e do P97,5 do intervalo de referência.

Os exames do Paciente 3 revelam pobre controle metabólico, com níveis sempre muito aumentados de leucina (Fig. 30). Mantém-se a mesma tendência observada nos demais pacientes, de baixa concentração de alguns aminoácidos. Nesse caso, no entanto, ocorre grande oscilação de suas concentrações, havendo momentos, inclusive, em que há elevações inespecíficas de alguns aminoácidos como tirosina e fenilalanina. Foi observada deficiência sérica dos aminoácidos arginina, isoleucina, glutamina e alanina. Devido aos altos níveis de leucina, houve influxo sérico insuficiente da grande maioria dos aminoácidos. Os dados de ingestão alimentar estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 – Recomendações dietéticas e estimativa de ingestão de energia e nutrientes
(Paciente 3)

	Energia (Kcal/dia)	Proteína^a (g/dia)	Leucina (mg/dia)	Isoleucina (mg/dia)	Valina (mg/dia)
Recomendação^c	1700	≥35	360 - 695	215 - 420	250 - 490
1	1079	36	618	356	430
2	935	36	274	146	171 + 200 ^b
3	1147	36	607	342	419
4	1333	41	710	404 + 150	511

^a Proteína total, fornecida pela dieta e fórmula metabólica especial isenta de AACR.

^b Os somatórios representam a quantidade do aminoácido obtido pela dieta e a fornecida por suplementação.

^c Fonte: ACOSTA e YANNICELLI, 2001.

Trata-se de uma paciente com hábito alimentar seletivo e baixa aceitação da dieta. O consumo de aminoácidos manteve-se dentro da faixa recomendada, mas não foi acompanhado por adequação dos seus níveis séricos. O exame 2 foi realizado durante quadro de infecção viral, no qual a criança apresentava prostração e redução da ingestão alimentar. Nesse momento a família instituiu dieta com menor quantidade de proteína natural e iniciou suplementação de valina. Ainda assim, não foi possível manter a adequada ingestão energética, o que provavelmente resultou em aumento do catabolismo proteico, explicando a manutenção da alta concentração de leucina. Diante de níveis muito reduzidos de isoleucina foi realizada nova dosagem após 15 dias, que já evidenciou normalização de seus valores séricos, ainda sem suplementação. A orientação dietética foi de reduzir o aporte de proteína natural e foi iniciada suplementação de isoleucina para prevenir sua deficiência.

5.2.3.4 **Paciente 4**

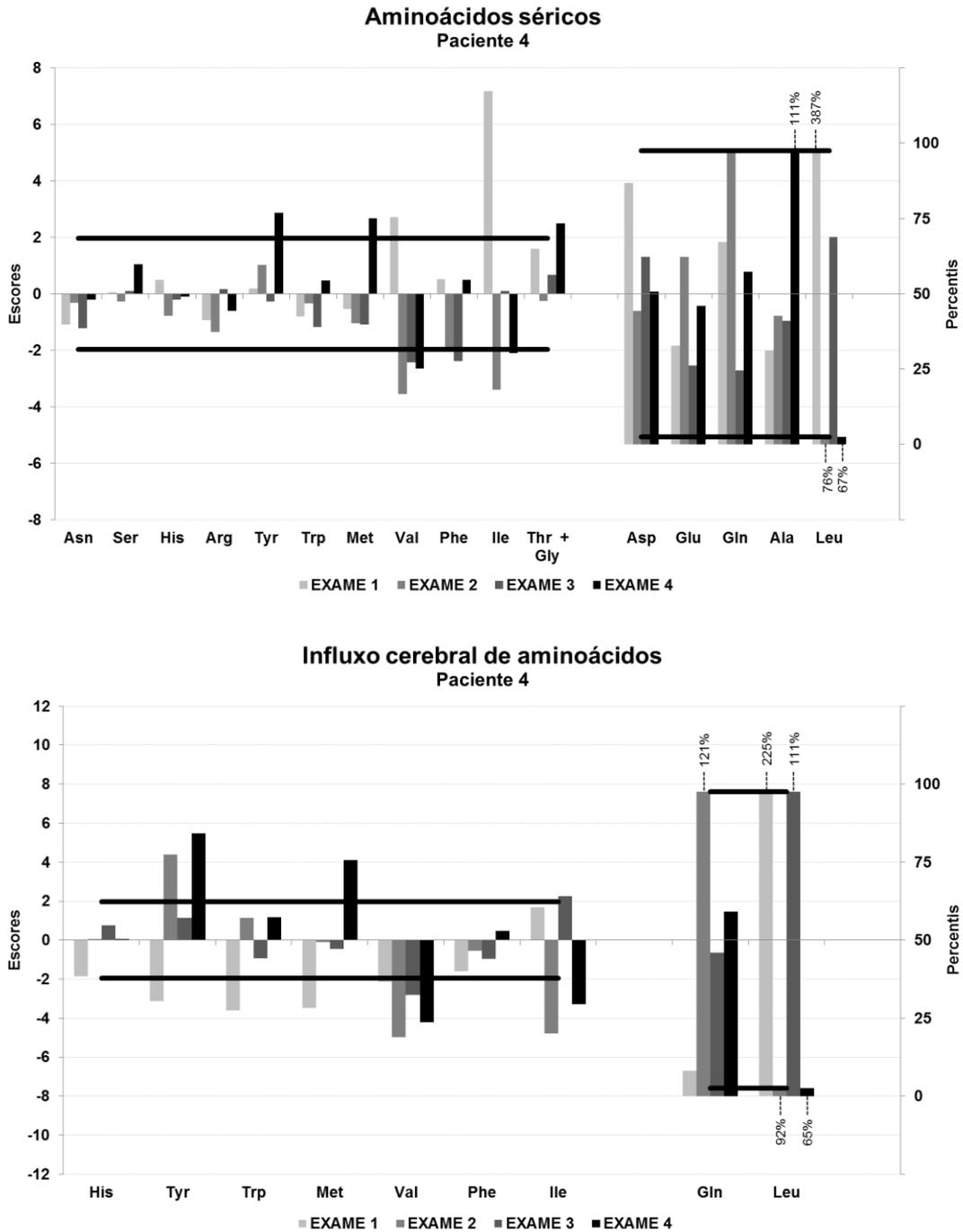


Figura 31: Resultados das dosagens de aminoácidos no plasma e influxo cerebral de aminoácidos do Paciente 4. As barras horizontais representam o intervalo de normalidade segundo método paramétrico (eixo da esquerda) e método não paramétrico (eixo da direita). O eixo horizontal central indica o valor médio para os dados (média ou mediana). Os percentuais localizados abaixo e acima das barras no gráfico de percentis indicam, respectivamente, quanto o valor observado no exame do paciente representa do P2,5 e do P97,5 do intervalo de referência.

No caso do Paciente 4 não houve deficiências específicas de outros aminoácidos, a não ser os AACR (Fig. 31). Observa-se grande oscilação das concentrações desses aminoácidos entre as dosagens, que variaram entre o excesso e a deficiência e em nenhum exame foi observado seu adequado controle. Os momentos de deficiência de leucina levaram a um baixo influxo desse aminoácido e coincidiram com níveis séricos e influxos aumentados de alguns de seus competidores, como tirosina, metionina e glutamina. O influxo de valina manteve-se sempre abaixo do normal, ainda quando seus níveis séricos encontravam-se aumentados. Houve também baixo influxo de isoleucina quando seus níveis séricos encontraram-se reduzidos. Os dados de estimativa de ingestão alimentar estão descritos na tabela 10. Não houve qualquer intercorrência clínica no período em que foram realizados os exames.

Tabela 10 – Recomendações dietéticas e estimativa de ingestão de energia e nutrientes (Paciente 4)

	Energia (Kcal/dia)	Proteína^a (g/dia)	Leucina (mg/dia)	Isoleucina (mg/dia)	Valina (mg/dia)
Recomendação^c	1700	≥35	360 - 695	215 - 420	250 - 490
1	1023	27	527	299	366
2	1091	32	507	289	363
3	1135	29	549	310	383
4	1331	33	703	413 + 100 ^b	509 + 100

^a Proteína total, fornecida pela dieta e fórmula metabólica especial isenta de AACR.

^b Os somatórios representam a quantidade do aminoácido obtido pela dieta e a fornecida por suplementação.

^c Fonte: ACOSTA e YANNICELLI, 2001.

Novamente observa-se ingestão de AACR adequada, porém níveis séricos excessivos ou insuficientes desses aminoácidos. A suplementação de isoleucina e valina (100 mg/dia) foi instituída na tentativa de corrigir a concentração sérica desses aminoácidos. Após o resultado do último exame, no entanto, a intervenção dietética principal foi o aumento do aporte de proteína natural da dieta para correção da deficiência de leucina. A criança não apresentou sinais clínicos específicos de deficiência de aminoácidos, no entanto foi observada perda ponderal entre as consultas 1 e 2 e consultas 3 e 4, que pode ser atribuída à restrição desses aminoácidos.

5.2.3.5 Paciente 5

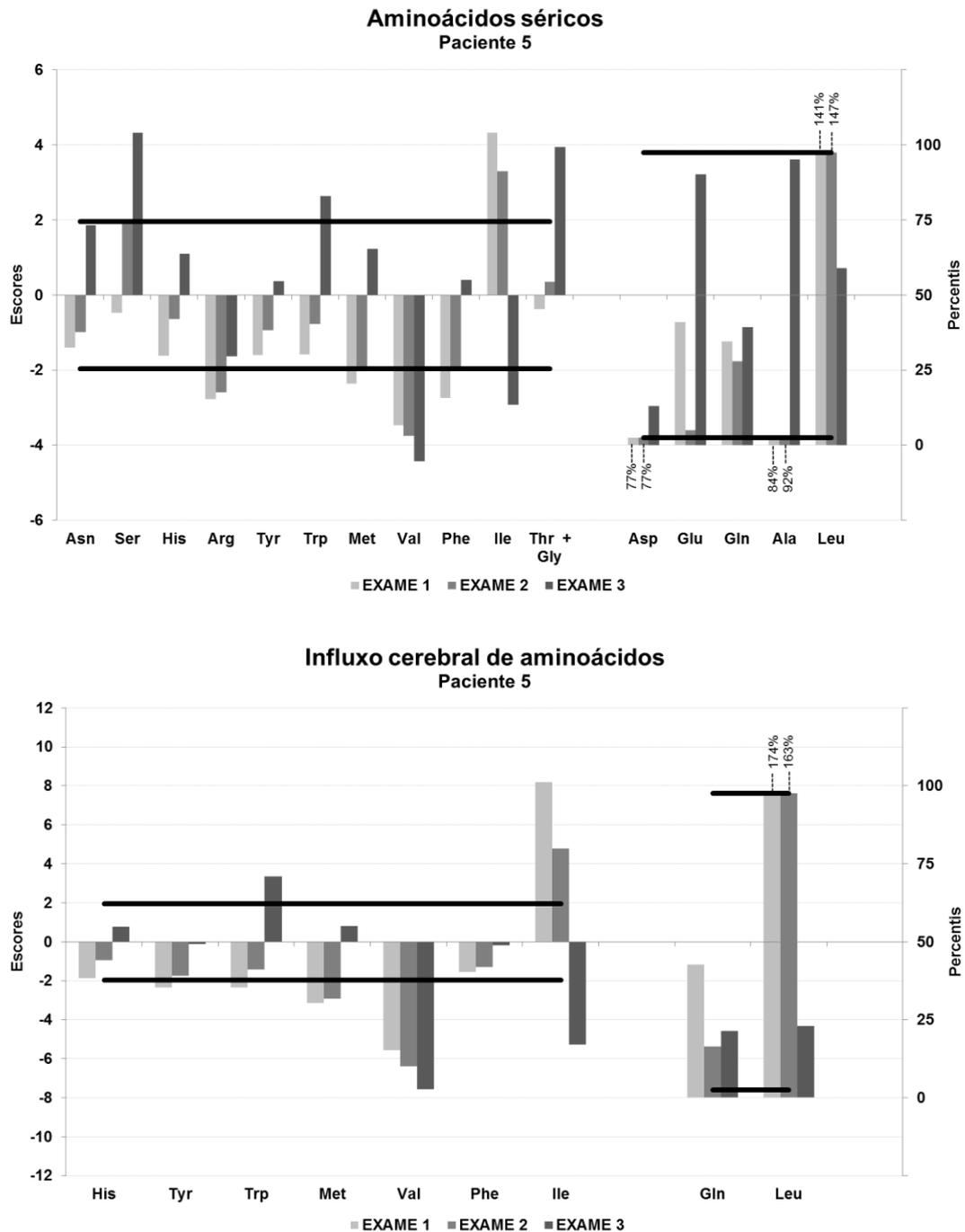


Figura 32: Resultados das dosagens de aminoácidos no plasma e influxo cerebral de aminoácidos do Paciente 5. As barras horizontais representam o intervalo de normalidade segundo método paramétrico (eixo da esquerda) e método não paramétrico (eixo da direita). O eixo horizontal central indica o valor médio para os dados (média ou mediana). Os percentuais localizados abaixo e acima das barras no gráfico de percentis indicam, respectivamente, quanto o valor observado no exame do paciente representa do P2,5 e do P97,5 do intervalo de referência.

Os exames do Paciente 5 demonstram deficiências importantes de alguns aminoácidos, como arginina, metionina, valina, fenilalanina, aspartato e alanina (Fig. 32). Houve uma redução progressiva da concentração sérica de leucina, acompanhado por queda dos demais AACR, o que agravou a deficiência de valina e levou à deficiência de isoleucina no último exame. O decréscimo de leucina foi acompanhado do aumento dos aminoácidos serina, triptofano e treonina + glicina, a níveis acima do limite superior do intervalo de normalidade.

Em relação ao influxo cerebral, destaca-se a deficiência importante de influxo de valina em todos os exames, que foi agravada à medida que o nível sérico desse aminoácido decaiu. Mesmo a normalização do influxo de leucina no último exame foi insuficiente para promover a normalização de influxo dos aminoácidos isoleucina e valina, devido a seus níveis séricos muito baixos. Os dados de estimativa de ingestão alimentar estão descritos na tabela 11.

Tabela 11 – Recomendações dietéticas e estimativa de ingestão de energia e nutrientes (Paciente 5)

	Energia (Kcal/dia)	Proteína^a (g/dia)	Leucina (mg/dia)	Isoleucina (mg/dia)	Valina (mg/dia)
Recomendação^c	1300	≥30	275 - 535	165 - 325	190 - 375
1	1103	30	655	384	416
2	1211	30	711	409	454
3	1134	29	672	340	381 + 120 ^b

^a Proteína total, fornecida pela dieta e fórmula metabólica especial isenta de AACR.

^b Os somatórios representam a quantidade do aminoácido obtido pela dieta e a fornecida por suplementação.

^c Fonte: ACOSTA e YANNICELLI, 2001

Observa-se que o paciente apresenta ingestão energética próxima ao adequado, mas, ainda assim, evolui com baixo ganho pñdero-estatural, que pode ser explicado pelas deficiências específicas de aminoácidos. A ingestão estimada de AACR esteve acima da recomendação na maioria das consultas e ainda assim observou-se deficiência desses aminoácidos em alguns exames. A intervenção dietética se baseou no aumento da oferta de calorias não proteicas e no aumento da proporção de proteína natural, além de suplementação de valina e também de isoleucina após o resultado do último exame.

5.2.4 Interpretação dos resultados das dosagens de aminoácidos e influxo cerebral

Apesar de alguns pacientes apresentarem variações pontuais específicas de certos aminoácidos, pode ser observado um padrão de alterações mais predominantes e comuns a todos eles. Entre estas, destacam-se os níveis séricos aumentados dos AACR, conforme esperado pela doença, mas também a deficiência de isoleucina e valina em algumas dosagens. Provavelmente devido a sua menor concentração na proteína natural em relação à leucina, os níveis de isoleucina e valina decaíram de forma acentuada durante o tratamento dietoterápico, tornando comum sua deficiência. A deficiência de alanina foi também muito prevalente entre os pacientes.

Em relação à análise de influxo cerebral de aminoácidos neutros, todos os pacientes apresentam influxo aumentado de leucina e consequente redução dos demais aminoácidos. Os déficits de influxo mais prevalentes foram os de tirosina, triptofano e valina. Se a deficiência de valina for prolongada e tiver ocorrido também durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral e mielinização, pode ser causa da microcefalia observada em dois dos pacientes (STRAUSS et al., 2010).

Estudos indicam que a produção de serotonina no sistema nervoso central é diretamente relacionada à concentração sérica de triptofano, seu aminoácido precursor, e ao seu influxo no sistema nervoso central (YOUNG e GAUTHIER, 1981; YOUNG, 1996; TRULSON e JACOBS, 1976). Baixos níveis de serotonina estão relacionados a diversos distúrbios de comportamento, tais como depressão, ansiedade, transtorno bipolar e irritabilidade (WAIDER et al., 2011). Experimentos simulando a deficiência central de serotonina em camundongos observaram, também, retardo do crescimento, maior letalidade no período pós-natal, alteração do padrão de sono, da termorregulação, da frequência cardíaca e da pressão arterial dos animais (ALELINA et al., 2009). Embora o grau de comprometimento neurológico das crianças incluídas nesse estudo torne difícil a identificação de tais distúrbios de comportamento, estudos com adultos com MSUD demonstram uma maior prevalência desses transtornos de comportamento (STRAUSS et al., 2010).

A tirosina, por sua vez, é precursora de catecolaminas (epinefrina, norepinefrina e dopamina) e sua deficiência, mesmo que moderada, pode trazer prejuízos às funções neurológicas (KALSNER et al., 2001) e alterações comportamentais (RIEMENSBERGER et al., 2011). Segundo Morton e colaboradores (2002), a deficiência de tirosina no sistema nervoso central de pacientes com MSUD é comum e pode estar envolvida no déficit

neurológico devido à limitação da produção de epinefrina e norepinefrina. A menor concentração de dopamina no tecido cerebral foi confirmada em um modelo animal de MSUD por Zinnanti e colaboradores (2009) e pode também desencadear alterações neurológicas motoras, como distonia e presença de sinal de pseudo Babinski em pacientes com a doença (MORTON et al., 2002). Esses achados são observados em nossos pacientes durante descompensação aguda e podem, portanto, estar relacionadas ao influxo insuficiente de tirosina no sistema nervoso central.

Pelos gráficos apresentados é possível observar que alguns pares de aminoácidos séricos possuem tendências similares de aumento e decréscimo. Diante disso foram realizados testes de correlação para averiguar a significância estatística dessas observações, para grupo caso e controle. Observou-se que existe um maior número de correlações significativas entre diferentes aminoácidos no grupo controle, em relação ao grupo caso. Esse resultado pode, em parte, ser atribuído ao menor número amostral do grupo de pacientes, porém pode também indicar que existe uma alteração da homeostase e das relações entre concentrações de aminoácidos em indivíduos com MSUD.

Outras correlações foram observadas no grupo de pacientes, mas não no grupo controle. Dentre estas, a mais clássica e já descrita na literatura é a correlação negativa entre leucina e alanina. As altas concentrações de ácido α -cetoisocapróico observadas em pacientes com MSUD estimulam a via de transaminação reversa, com formação de leucina e consumo de glutamato e alanina, levando à depleção de seus níveis séricos (MORTON et al., 2002; STRAUSS et al., 2010). Esses autores recomendam, inclusive, que a relação leucina/alanina seja utilizada como parâmetro de diagnóstico e tratamento. Embora a redução da concentração sérica de glutamato seja esperada pela ativação dessa via, apenas a correlação com alanina apresentou significância estatística no grupo de pacientes neste estudo (Fig. 33).

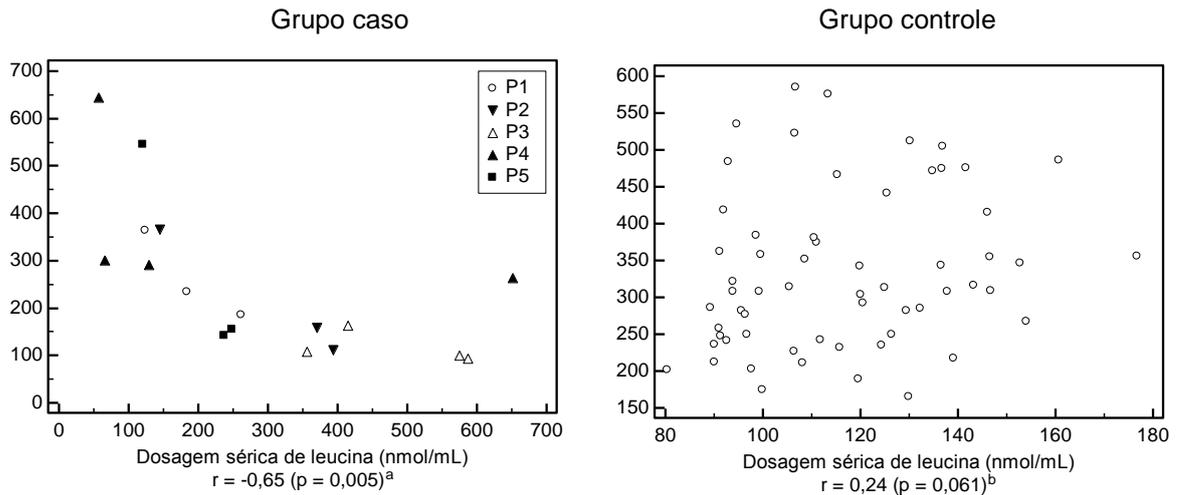


Figura 33: Resultado das correlações entre as concentrações séricas de leucina e alanina. No primeiro gráfico cada tipo de marcador representa um paciente. Abaixo de cada gráfico estão descritos o coeficiente de correlação (r) encontrado pelo teste de Pearson^a ou Spearman^b e seu nível de significância estatística (p).

A mesma relação encontrada entre leucina e alanina foi também observada para os aminoácidos isoleucina e alanina. Para o grupo de pacientes encontrou-se correlação negativa entre os dois aminoácidos, enquanto no grupo controle foi observada correlação positiva (Fig. 34).

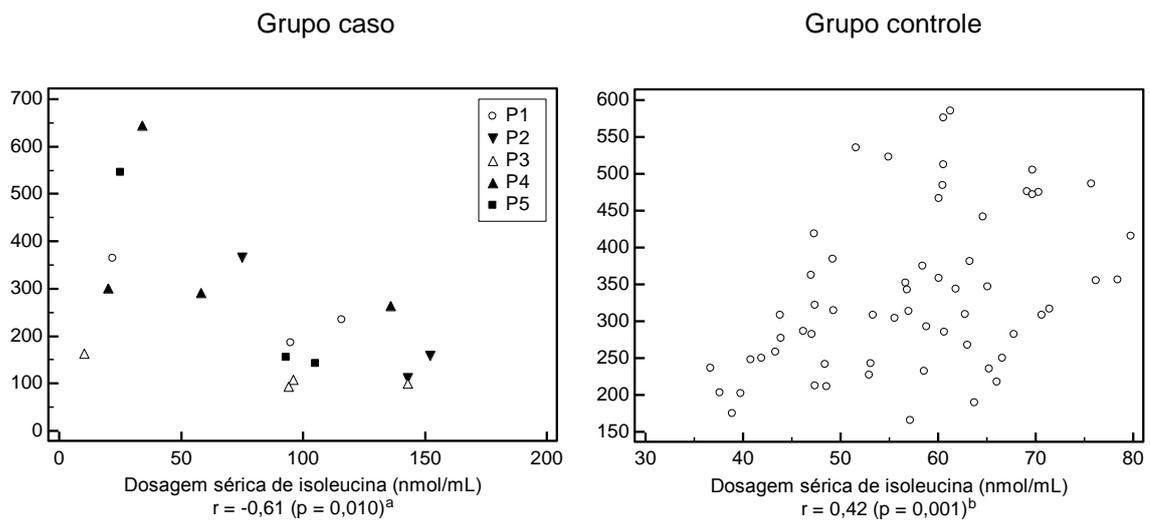


Figura 34: Resultado das correlações entre as concentrações séricas de isoleucina e alanina. No primeiro gráfico cada tipo de marcador representa um paciente. Abaixo de cada gráfico estão descritos o coeficiente de correlação (r) encontrado pelo teste de Pearson^a ou Spearman^b e seu nível de significância estatística (p).

Esse achado é relevante, uma vez que indica que a elevação das concentrações de isoleucina pode também contribuir para a deficiência sérica de alanina nesses pacientes. O mecanismo é provavelmente similar ao observado pela leucina, com estímulo à transaminação reversa do ácido α -ceto- β -metilisovalerato à isoleucina, com consumo de alanina (YUDKOFF et al., 2005). A correlação não foi observada no grupo controle possivelmente por depender de níveis séricos aumentados desses aminoácidos.

O somatório dos aminoácidos leucina e isoleucina apresentou correlação ainda mais forte, com maior valor coeficiente de correlação (r) e menor valor p , que as correlações individuais. Essa análise reforça a ideia de que o aumento de ambos os aminoácidos contribui para o decréscimo de alanina observado em crianças com MSUD (Fig. 35). Essas observações podem servir como um alerta de que, apesar do aumento da concentração de isoleucina colaborar para melhor padrão de influxo cerebral de aminoácidos, ele pode também agravar a deficiência de alanina.

Grupo caso

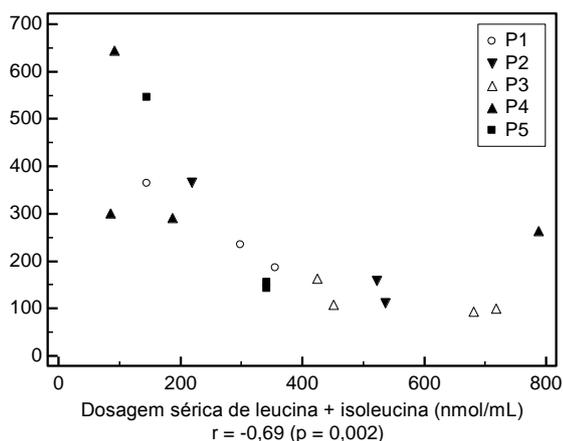


Figura 35: Resultado das correlações entre as concentrações séricas de leucina + isoleucina e alanina. Cada tipo de marcador representa um paciente. Abaixo do gráfico estão descritos o coeficiente de correlação (r) encontrado pelo teste de Pearson e seu nível de significância estatística (p).

Apesar de ser um aminoácido considerado como não essencial, pois pode ser produzido pelo organismo, a deficiência de alanina parece ser crítica em pacientes com MSUD. Assim, considera-se que ela pode tornar-se condicionalmente essencial na presença de altos níveis de leucina e, segundo observamos, também de isoleucina. A deficiência sérica de alanina compromete, principalmente, os mecanismos de produção de energia e anabolismo muscular, podendo levar à hipoglicemia e prejuízo da síntese proteica no tecido muscular (YUDKOFF et al., 2005).

As respostas metabólicas às deficiências específicas de aminoácidos são ainda pouco compreendidas. Estudos recentes têm descrito um papel relevante da restrição ou privação de aminoácidos como leucina e metionina na modulação da lipogênese em camundongos. Os efeitos da dieta restrita em aminoácidos essenciais são, em geral, perda de peso e alteração do gasto energético e têm sido atribuídos à redução da expressão de genes lipogênicos por elementos regulatórios (ANTHONY, MORRISON e GETTYS, 2013). Esses estudos demonstram que os mecanismos envolvidos vão muito além da limitação de síntese proteica e abrem nova perspectiva de estudo na área do metabolismo de aminoácidos.

5.2.5 Análise da ingestão dietética

Durante o andamento do estudo e análise dos resultados de cada paciente foi possível observar que muitas vezes não há a resposta esperada às intervenções dietéticas instituídas, tornando o tratamento difícil e complexo. As figuras 36 e 37 representam os resultados das correlações entre a ingestão de leucina, isoleucina e valina, ajustadas para peso corporal, e suas respectivas concentrações séricas. Os pacientes foram agrupados em um único teste, mas estão representados nos gráficos como marcadores diferentes.

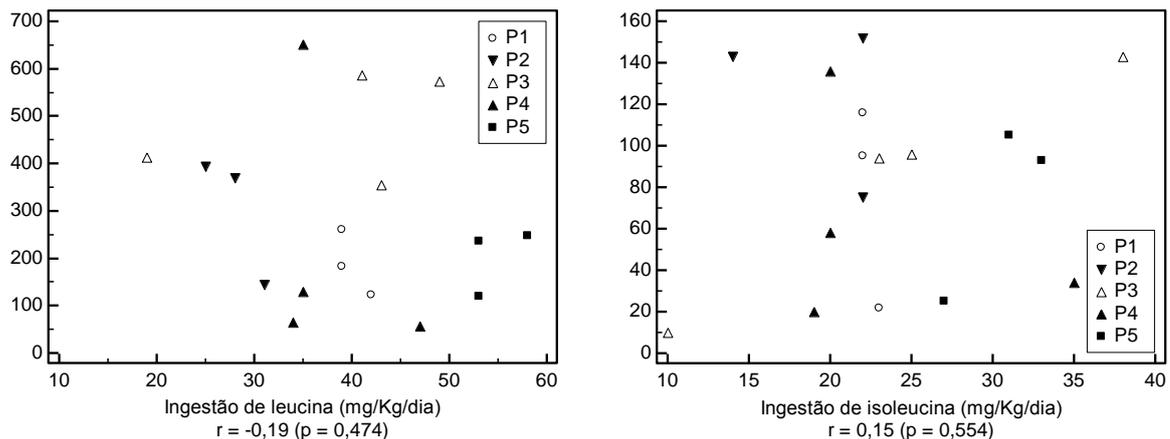


Figura 36: Resultado das correlações entre ingestão e concentração sérica de leucina e isoleucina. Cada tipo de marcador representa um paciente. Abaixo de cada gráfico estão descritos o coeficiente de correlação (r) encontrado pelo teste de Pearson e seu nível de significância estatística (p).

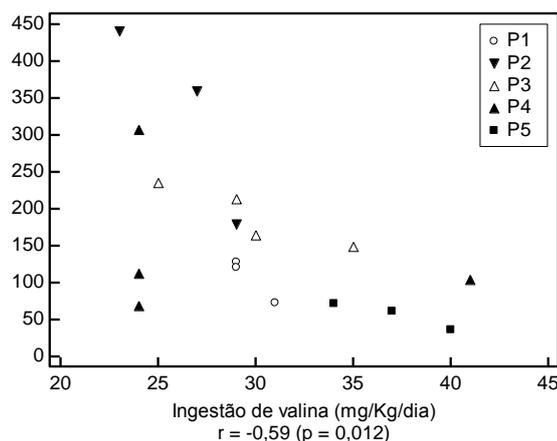


Figura 37: Resultado das correlações entre ingestão e concentração sérica de valina. Cada tipo de marcador representa um paciente. Abaixo do gráfico estão descritos o coeficiente de correlação (r) encontrado pelo teste de Pearson e seu nível de significância estatística (p).

Não houve correlação estatisticamente significativa entre ingestão e dosagem sérica para os aminoácidos leucina e isoleucina. No caso do aminoácido valina foi encontrada uma correlação significativa, mas inversa à esperada. Esperava-se encontrar correlação entre essas variáveis, uma vez que o tratamento se baseia essencialmente no controle desses aminoácidos na dieta. A não observação dessa correlação, no entanto, pode ser explicada por diversos fatores, sendo um deles o método de estimativa de ingestão alimentar. A ferramenta utilizada foi o recordatório de 24 horas que, por definição, avalia apenas a ingestão alimentar recente, de maneira pontual. A utilização de outro método de inquérito, como por exemplo, o registro alimentar de 72 horas, poderia resultar em dados de ingestão mais fidedignos, uma vez que avalia melhor a variação da dieta. Outras prováveis fontes de erro são baixa adesão à dieta e a utilização da proporção de aminoácidos nas proteínas para cálculo de ingestão, que pode ter resultado em estimativas pouco precisas do consumo de cada AACR.

Excluindo-se as interferências inerentes ao método de coleta de dados, a ausência de correlação pode ser um reflexo da relevância do estado metabólico do indivíduo na concentração sérica dos aminoácidos. Uma vez que os AACR são essenciais eles não são sintetizados de novo no organismo. Sua homeostase, portanto, é mantida pela ingestão dietética, proteólise de proteínas endógenas e degradação enzimática (WANDERS, DURAN e LOUPATTY, 2012), que no caso de pacientes com MSUD é praticamente nula. A utilização dos AACR como fonte energética ou seu desvio para a lipogênese é, dessa forma, insignificante. O metabolismo proteico, assim, parece ser o maior determinante da

concentração sérica desses aminoácidos. Sabe-se que o catabolismo proteico é responsável pela liberação de altas quantidades de AACR na circulação e pode ser desencadeado, por exemplo, por baixo consumo energético. O ganho de peso, por outro lado, pode levar a um decréscimo da concentração sérica desses aminoácidos, mesmo sem haver redução na quantidade ingerida.

A correlação inversa encontrada para ingestão e concentração sérica de valina não encontra justificativa clínica plausível. Houve redução do seu valor sérico em alguns pacientes ao longo do estudo e introdução de suplementação desse aminoácido na tentativa de corrigir esse déficit. No entanto, não foi observada a resposta clínica esperada, provavelmente devido ao curto período de suplementação ou à dose prescrita. A correlação, portanto, existe, mas sem que haja entre as variáveis uma relação direta de causa e efeito.

O tratamento dietético de crianças com MSUD, portanto, vai muito além da restrição dos AACR dentro dos limites descritos na literatura. Confirma-se que, além da variação na tolerância a cada aminoácido entre pacientes, outros fatores como adequação energética, proporção de fórmula metabólica especial e proteína natural, presença de estresse metabólico, ganho ou perda de peso devem ser continuamente observados. A recomendação da ingestão de aminoácidos é dinâmica e a resposta clínica às intervenções dietéticas precisa ser persistentemente acompanhada pela dosagem sérica de aminoácidos.

Os resultados desse estudo confirmam as observações de estudos anteriores (MORTON, 2002; STRAUSS et al., 2010) e reforçam a necessidade de adoção de práticas adicionais no tratamento de crianças com MSUD, adaptadas às especificidades de nossos pacientes. Dessa forma, além do controle dos níveis de leucina, é necessária atenção às concentrações séricas dos demais aminoácidos. A suplementação de isoleucina e valina torna-se essencial para adequação de seus níveis séricos e influxo cerebral. À medida que a manutenção dos níveis de leucina dentro dos valores normais nem sempre é possível, deve-se preconizar valores mais elevados de seus competidores pelo transporte por LAT1, principalmente triptofano e tirosina. Para isso, pode ser utilizada a suplementação isolada ou fórmulas metabólicas especiais com maior teor desses aminoácidos, que deve também ser rica em alanina para adequação de seus níveis séricos.

5.3 Caracterização molecular

5.3.1 Paciente 1

O sequenciamento dos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT do Paciente 1 resultou na identificação de uma deleção de dois nucleotídeos no éxon 5 do gene BCKDHB, que codifica a subunidade E1 β . A alteração foi encontrada em homozigose, condizente com o fato dos pais serem consanguíneos, primos de 1º grau. A mutação c.595_596delAG (p.P200X) acarreta mudança na matriz de leitura, resultando inicialmente na substituição do códon AGT por TCC, ambos codificando o aminoácido serina. Na posição seguinte, no entanto, é criado um códon de fim prematuro TGA (Fig. 38 e 39).

```

AGGCGGCGTGCGGCTGCATAGCCTGAGAATCCCGGTGGTGAGCGGGGATGGCGGTTGTAGCGGCGGCTGC
CGGCTGGCTACTCAGGCTCAGGGCGGCAGGGGCTGAGGGGCACTGGCGTCGGCTTCCTGGCGCGGGGCTG
GCGCGGGGCTTTTTGCACCCCGCCGCGACTGTCGAGGATGCGGCCAGAGGCGGCAGGTGGCTCATTTTA
CTTTCCAGCCAGATCCGGAGCCCCGGGAGTACGGGCAAAATCAGAAAATGAATCTTTTCCAGTCTGTAAC
AAGTGCCTTGGATAACTCATTGGCCAAAGATCCTACTGCAGTAATATTTGGTGAAGATGTTGCCTTTGGT
GGAGTCTTTAGATGCACTGTTGGCTTGCAGACAAAATATGGAAAAGATAGAGTTTTTAATACCCATTGT
GTGAACAAGGAATTGTTGGATTTGGAATCGGAATTGCGGTCCTGAGCTACTGCCATTGCGGAAATTCA
GTTTGCAGATTATATTTTCCCTGCATTTGATCAGATTGTTAATGAAGCTGCCAAGTATCGCTATCGCTCT
GGGGATCTTTTTAACTGTGGAAGCCTCACTATCCGGTCCCCCTGGGGCTGTGTTGGTCATGGGGCTCTCT
ATCATTCTCAGACTCCTGAAGCATTTTTTGGCCATTGCCAGGAATCAAGGTGGTTATACCCAGAAGCCC
TTTCCAGGCCAAAGGACTTCTTTTGTGCATGCATAGAGGATAAAAAATCCTTGTATATTTTTTGAACCTAAA
ATACTTTACAGGGCAGCAGCGGAAGAAGTCCCTATAGAACCATACAACATCCCCTGTCCCAGGCCGAAG
TCATACAGGAAGGGAGTGATGTTACTCTAGTTGCCCTGGGGCACTCAGGTTTCATGTGATCCGAGAGGTAGC
TTCCATGGCAAAAGAAAAGCTTGGAGTGTCTTGTGAAGTCATTGATCTGAGGACTATAATACCTTGGGAT
GTGGACACAATTTGTAAGTCTGTGATCAAAAACAGGGCGACTGCTAATCAGTCACGAGGCTCCCTTGACAG
GCGGCTTTGCATCGGAAATCAGCTCTACAGTTCAGGAGGAATGTTTCTTGAACCTAGAGGCTCCTATATC
AAGAGTATGTGGTTATGACACACCATTTCTCACATTTTTGAACCATCTACATCCCAGACAAATGGAAG
TGTTATGATGCCCTTCGAAAAATGATCAACTATTGACCATATAGAAAAGCTGGAAGATTATGACTAGATA
TGGAAATATTTTTTCTGAATTTTTTTTTATATTTCCCTCCGACTTACCTCTTTTTGAAAAGAGAGTTTTTA
TTAAATGAACCATCATGATATTGGCTGAAAAGTTCTACATTCTATTATTGTATTGTAACACACATGTATT
GATGATTTTCATTAAGAGTTTCAGATTAACTTTGAAAAATATTCCACATGGTAATCTTATAAATTTCTGTT
TAATTACATCTGTAAATATTATGTGTGTGATAGTATTCAATAAAAGTAAAAATCAAATTTGTCAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAA

```

Figura 38: cDNA do gene BCKDHB. O códon destacado em amarelo representa o início da transcrição. Em vermelho estão destacados os nucleotídeos deletados e em azul o primeiro códon a ser consequentemente modificado.

Fonte: NCBI, 2012

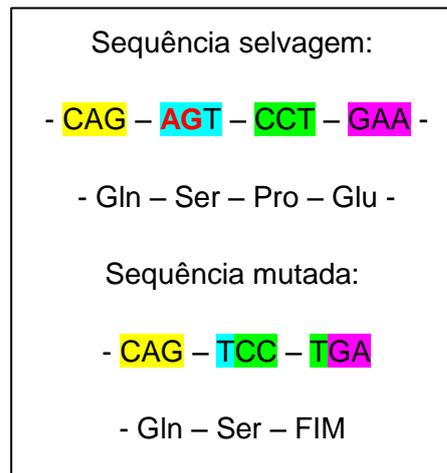


Figura 39: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.595_596delAG no cDNA e na proteína resultante. Os nucleotídeos deletados estão destacados em vermelho na sequência selvagem.

Fonte: NCBI, 2012

A mutação foi previamente descrita por Henneke e colaboradores (2003), em dois pacientes, em heterozigose composta. Os autores concluíram que a alteração pode ser considerada como o defeito primário da doença, uma vez que leva ao término prematuro da tradução. A proteína gerada apresenta 200 resíduos, correspondendo a aproximadamente metade do tamanho da proteína original (Fig. 40). As descrições anteriores dessa mutação (Quadro 7) foram todas em populações europeias e os pais do paciente relatam descendência portuguesa, sugerindo uma origem única para a alteração.

```
MAVAAAAAGWLLRLRAAGAEHWRRLPGAGLARGFLHPAATVEDAAQRRQVAHFTFQPDPEPREYGQTQK
MNLFSVTSALDNSLAKDPTAVIFGEDVAFGGVFRCTVGLRDKYKDRVFNTPLCEQGIVGFGIGIAVTG
ATAIAEIQFADYIFPAFDQIVNEAAKYRYSRDLFNCGLTIRSPWGCVGHGALYHSQS / PEAFFAHCPG
IKVVIPRSPFQAKGLLLSCIEDKNPCIFFEPKILYRAAAEEVPIEPYNIPLSQAEVIQEGSDVTLVAWGT
QVHVIREVASMKEKLGVSCEVIDLRTIIPWDVDTICKSVIKTGRLLISHEAPLTGGFASEISSTVQEEC
FLNLEAPISRVCGYDTPFPHIFEPFYIPDKWKCYDALRKMINY
```

Figura 40: Sequência de aminoácidos da subunidade E1β. O ponto da interrupção na proteína mutada está representado pela barra vermelha.

Fonte: NCBI, 2012

Quadro 7 – Descrições anteriores da mutação c.595_596delAG

Autores/ano	Nacionalidade	Apresentação	Fenótipo
HENNEKE et al., 2003	Espanhola	Heterozigose	Clássico
	Austriaca	Heterozigose	Variante
QUENTAL et al., 2008	Portuguesa	Heterozigose	Clássico
	Portuguesa	Heterozigose	Clássico

Foram encontradas, ainda, quatro alterações no gene BCKDHA desse mesmo paciente. Todas são transições e foram identificadas em heterozigose no íntron 7 c.996-6G>A (g.30205G>A), no íntron 8 c.1168-66C>T (g.31585C>T) e na região 3'UTR c.*125C>T (g.31946C>T) e c.*334C>T (g.32155C>T). Nenhuma dessas alterações encontra-se descrita na literatura como mutação ou como polimorfismo (NCBI, 2012), desconhecendo-se, portanto, se essas possuem efeitos na proteína resultante.

5.3.2 *Paciente 2*

Foi encontrada uma transição no éxon 9 do gene DBT da paciente em questão, presente em homozigose. Os pais não referiram parentesco, mas pode haver consanguinidade não relatada, principalmente por se tratar de uma família natural de um município pequeno, com cerca de 20 mil habitantes. A mutação c.1193T>C (p.L398P) resulta na modificação do códon CTT para CCT levando à substituição do aminoácido leucina por prolina (Fig. 41 e 42). A variação foi descrita por Quental e colaboradores (2008), também em homozigose, em um indivíduo com fenótipo clássico de origem portuguesa, diagnosticado pelo programa de triagem neonatal do país. A família da paciente em questão relata descendência portuguesa, podendo indicar origem única da mutação nos dois casos. Segundo os autores a estrutura rígida da prolina, um aminoácido cíclico, sugere que essa substituição promova uma alteração crítica na estrutura da subunidade E2, afetando seu núcleo hidrofóbico. Esses dados, aliados ao alto grau de conservação do resíduo de leucina entre as espécies analisadas, levaram os autores a concluir que se trata de uma mutação patogênica. Segundo análise pelo *software* de predição PolyPhen-2® a substituição desses aminoácidos também foi identificada como provavelmente patogênica, com um escore de 0,996, observando-se os critérios de conservação entre espécies, alterações estruturais e funcionais da proteína (ADZHUBEI et al., 2010).

```

ATTTCCGGGGTAAGATGGCTGCAGTCCGTATGCTGAGAACCTGGAGCAGGAATGCGGGGAAGCTGATTTG
TGTTTCGCTATTTTCAAACATGTGGTAATGTTTCATGTTTTGAAGCCAAATATGTGTGTTTCTTTGGTTAT
CCTTCATTCAAGTATAGTCATCCACATCACTTCCTGAAAACAACTGCTGCTCTCCGTGGACAGGTTGTTT
AGTTCAAGCTCTCAGACATTGGAGAAGGGATTAGAGAAGTAACTGTTAAAGAATGGTATGTAAAAGAAGG
AGATACAGTGTCTCAGTTTGATAGCATCTGTGAAGTTCAAAGTGATAAAGCTTCTGTTACCATCACTAGT
CGTTATGATGGAGTCATTAATAAACTCTATTATAATCTAGACGATATTGCCTATGTGGGGAAGCCATTAG
TAGACATAGAAACGGAAGCTTTAAAAGATTGAGAAGAAGATGTTGTTGAAACTCCTGCAGTGTCTCATGA
TGAACATACACACCAAGAGATAAAGGGCCGAAAAACACTGGCAACTCCTGCAGTTCGCCGTCTGGCAATG
GAAAACAATATTAAGCTGAGTGAAGTTGTTGGCTCAGGAAAAGATGGCAGAATACTTAAAGAAGATATCC
TCAACTATTTGGAAAAGCAGACAGGAGCTATATTGCCTCCTTCACCCAAAGTTGAAATTATGCCACCTCC
ACCAAAGCCAAAAGACATGACTGTTCTATACTAGTATCAAAACCTCCGGTATTCACAGGCAAAGACAAA
ACAGAACCCATAAAAAGGCTTTCAAAAAGCAATGGTCAAGACTATGTCTGCAGCCCTGAAGATACCTCATT
TTGGTTATTGTGATGAGATTGACCTTACTGAACTGGTTAAGCTCCGAGAAGAATAAAACCCATTGCATT
TGCTCGTGGAATTAACCTCTCCTTTATGCCTTTCTTCTTAAAGGCTGCTTCTTGGGATTACTACAGTTT
CCTATCCTTAACGCTTCTGTGGATGAAAAGTCCAGAAATATAACATATAAGGCTTCTCATAACATTGGGA
TAGCAATGGATACTGAGCAGGGTTTGATTGTCCCTAATGTGAAAAATGTTTCAGATCTGCTCTATATTTGA
CATCGCCACTGAACTGAACCGCCTCCAGAAATTGGGCTCTGTGGGTCAGCTCAGCACCCTGATCTTACA
GGAGGAACATTTACTCTTCC...

```

Figura 41: Parte da sequência de cDNA do gene DBT. O códon destacado em amarelo representa o início da transcrição. Em vermelho está destacado o nucleotídeo substituído e em azul o códon consequentemente modificado.

Fonte: NCBI, 2012

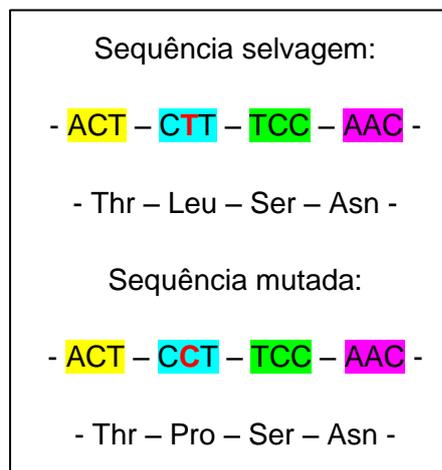


Figura 42: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.1193T>C no cDNA e na proteína resultante. O nucleotídeo substituído está destacado em vermelho na sequência selvagem e mutada.

Fonte: NCBI, 2012

5.3.3 Paciente 3

Foram encontradas duas mutações de ponto diferentes no gene BCKDHB do Paciente 3, filho de pais não consanguíneos, caracterizando heterozigose composta. Uma das mutações consiste em uma transição c.359T>C, no éxon 4 do gene, que resulta na modificação do códon e troca de um aminoácido fenilalanina para serina na proteína final (p.F120S) (Fig. 43 e 44). A mutação não está descrita na literatura, mas segundo análise realizada no *software* PolyPhen-2® ela é provavelmente patogênica (escore 1,000) por resultar na modificação de um resíduo altamente conservado entre espécies por outro aminoácido com propriedades físico-químicas bastante diversas (ADZHUBEI et al., 2010).

```

AGGCGGCGTGC GGCTGCATAGCCTGAGAATCCCGGTGGTGAGCGGGGATCGCGGTTGTAGCGGCGGCTGC
CGGCTGGCTACTCAGGCTCAGGGCGGCAGGGGCTGAGGGGCACTGGCGTCGGCTTCCTGGCGCGGGGCTG
GCGCGGGGCTTTTTGCACCCCGCCGCGACTGTCGAGGATGCGGCCAGAGGCGGCAGGTGGCTCATTTTA
CTTTCCAGCCAGATCCGGAGCCCCGGGAGTACGGGCAAAACCTCAGAAAATGAATCTTTTCCAGTCTGTAAC
AAGTGCCTTGGATAACTCATTGGCCAAAAGATCCTACTGCAGTAATATTTGGTGAAGATGTTGCCTTTGGT
GGAGTCTTTAGATGCACTGTTGGCTTGCAGACAAAATATGGAAAAGATAGAGTTTAAATACCCCATTTGT
GTGAACAAGGAATTGTTGGATTTGGAATCGGAATTCGGTCACTGGAGCTACTGCCATTGCGGAAATTC
GTTTGCAGATTATATTTTCCCTGCATTTGATCAGATTGTTAATGAAGCTGCCAAGTATCGCTATCGCTCT
GGGGATCTTTTTAACTGTGGAAGCCTCACTATCCGGTCCCCCTGGGGCTGTGTTGGTCATGGGGCTCTCT
ATCATTCTCAGAGTCCTGAAGCATTTTTTGCCATTCGCCAGGAATCAAGGTGGTTATACCCAGAAGCCC
TTTCCAGGCCAAAAGGACTTCTTTTGTCAATGATAGAGGATAAAAAATCCTTGTATATTTTTTGAACCTAAA
ATACTTTACAGGCGCAGCAGCGGAAGAAGTCCCTATAGAACCATAACAACATCCCCTGTCAGGCGGAAG
TCATACAGGAAGGGAGTGTACTCTAGTTGCCTGGGGCACTCAGGTTTCATGTGATCCGAGAGGTAGC
TTCCATGGCAAAAAGAAAAGCTTGGAGTGTCTTGTGAAGTCATTGATCTGAGGACTATAATACCTTGGGAT
GTGGACACAATTTGTAAGTCTGTGATCAAAAACAGGGCGACTGCTAATCAGTCAAGGCTCCCTTGACAG
GCGGCTTTGCATCGGAAATCAGCTCTACAGTTTCAAGGAGGAATGTTTCTTGAACCTAGAGGCTCCTATATC
AAGAGTATGTGGTTATGACACACCATTTCCCTCACATTTTTGAACCATTTCTACATCCCAGACAAATGGAAG
TGTTATGATGCCCTTCGAAAAATGATCAACTATTGACCATATAGAAAAGCTGGAAGATTATGACTAGATA
TGGAATATTTTTTCTGAATTTTTTTTTTATATTTCCCTCCGACTTACCTCTTTTTGAAAAGAGAGTTTTTA
TTAAATGAACCATCATGATATTGGCTGAAAAGTTCTACATTTCTATTATTGTATTGTAACACACATGTATT
GATGATTTTTCATTAAGAGTTTTCAGATTAACCTTTGAAAAATATTCACATGGTAATCTTATAAATTTCTGTT
TAATTACATCTGTAAATATTATGTGTGTGATAGTATTCAATAAAGTAAAATCAAATGTCAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAA

```

Figura 43: cDNA do gene BCKDHB. O códon destacado em amarelo representa o início da transcrição. Em vermelho estão destacados os nucleotídeos substituídos nas duas mutações analisadas e em azul os códons que serão conseqüentemente modificados.

Fonte: NCBI, 2012

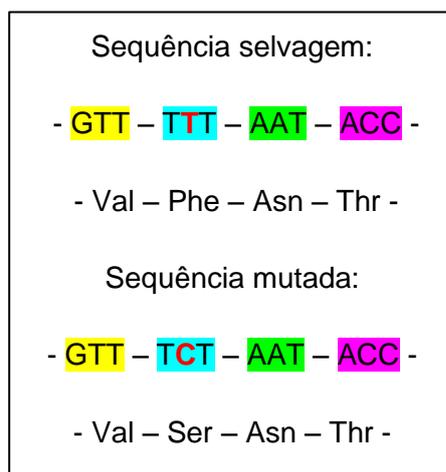


Figura 44: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.359T>C no cDNA e na proteína resultante. O nucleotídeo substituído está destacado em vermelho na sequência selvagem e mutada.

Fonte: NCBI, 2012

No outro alelo foi identificada uma transição c.1159C>T, no éxon 10 do gene, resultando na modificação de um resíduo de arginina para um códon de fim prematuro (p.R387x). A proteína gerada apresenta 386 resíduos, seis a menos que a proteína original (Fig. 43 e 45). Essa alteração poderia resultar no encurtamento do domínio C-terminal da proteína e, provavelmente, modificaria sua estrutura alfa-hélice observada entre os resíduos 379 e 390. Tal alteração pode prejudicar a estabilidade do mRNA ou reduzir a função enzimática da proteína final (Fig. 46). Outros autores já descreveram a presença de alterações na porção C-terminal da proteína E1 β levando ao fenótipo de MSUD (BASHYAM et al., 2012)

Sabe-se que 48% das mutações sem sentido são consequência da criação de um códon de fim TGA que, em 55% dos casos, surge de uma transição C>T decorrente da desaminação espontânea de 5-metilcitosina (ANTONARAKIS e COOPER, 2010). Nos genomas eucariotas esse tipo de mutação ocorre principalmente em dinucleotídeos CG, com uma frequência cinco vezes superior que em outros dinucleotídeos, sendo uma causa importante de doenças genéticas (KRAWCZAK, BALL e COOPER, 1998). Esse mecanismo de mutação poderia explicar a transição observada no gene do paciente em questão.

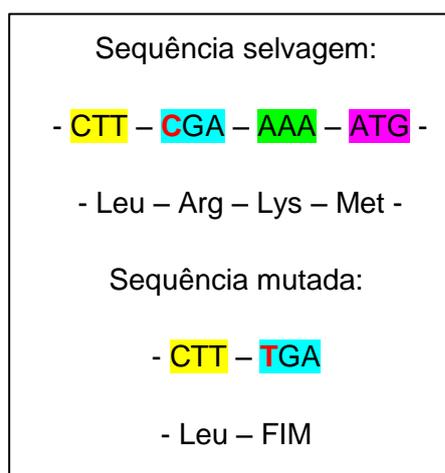


Figura 45: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.1159C>T no cDNA e na proteína resultante. O nucleotídeo substituído está destacado em vermelho na sequência selvagem e mutada.

Fonte: NCBI, 2012

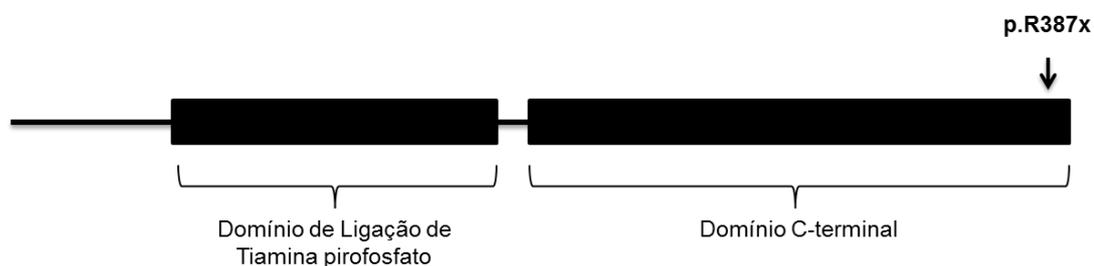


Figura 46: Domínios catalíticos da proteína E1β. A seta representa o ponto de interrupção da proteína resultante da mutação c.1159C>T (p.R387x).

Fonte: Adaptado de PROTEIN DATA BANK, 2013

5.3.4 Paciente 4

Foi identificada a mutação c.670G>T no éxon 6 do gene DBT, em homozigose. Os pais da criança são consanguíneos, primos de 2º grau. Essa transversoão resulta na modificação de um códon GAA para TAA, levando à substituição do aminoácido glutamato

na posição 224 da proteína por um códon de fim (p.E224X). O resultado é uma proteína truncada, com perda de 258 dos 482 resíduos da proteína original (Fig. 47 e 48).

```

ATTTCCGGGGTAAGATGGCTGCAGTCCGTATGCTGAGAACCTGGAGCAGGAATGCGGGGAAGCTGATTTG
TGTTTCGCTATTTTCAAACATGTGGTAATGTTTCATGTTTTGAAGCCAAATTATGTGTGTTTCTTTGGTTAT
CCTTCATTCAAGTATAGTCATCCACATCACTTCCTGAAAACAACTGCTGCTCTCCGTGGACAGGTTGTTT
AGTTCAAGCTCTCAGACATTGGAGAAGGGATTAGAGAAGTAACTGTTAAAGAATGGTATGTAAAAGAAGG
AGATACAGTGTCTCAGTTTTGATAGCATCTGTGAAGTTCAAAGTGATAAAGCTTCTGTTACCATCACTAGT
CGTTATGATGGAGTCATTAATAAACTCTATTATAATCTAGACGATATTGCCTATGTGGGGAAGCCATTAG
TAGACATAGAAACGGAAGCTTTAAAAGATTGAGAAGAAGATGTTGTTGAACTCCTGCAGTGTCTCATGA
TGAACATACACACCAAGAGATAAAGGGCCGAAAAACACTGGCAACTCCTGCAGTTCGCCGTCTGGCAATG
GAAAACAATATTAAGCTGAGTGAAGTTGTTGGCTCAGGAAAAGATGGCAGAATACTTAAAGAAGATATCC
TCAACTATTTGGAAAAGCAGACAGGAGCTATATTGCCTCCTTCACCCAAAGTTCAAATTATGCCACC...

```

Figura 47: Parte da sequência de cDNA do gene DBT. O códon destacado em amarelo representa o início da transcrição. Em vermelho está destacado o nucleotídeo substituído e em azul o primeiro códon a ser consequentemente modificado.

Fonte: NCBI, 2012

Sequência selvagem:

- AAA - GTT - GAA - ATT -

- Lys - Val - Glu - Ile -

Sequência mutada:

- AAA - GTT - TAA

- Lys - Val - FIM

Figura 48: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.670G>T no cDNA e na proteína resultante. O nucleotídeo que substituído está destacado em vermelho na sequência selvagem e mutada.

Fonte: NCBI, 2012

Essa mutação foi descrita pela primeira vez por Fisher e colaboradores (1993). Os autores identificaram uma deficiência na produção de E2 por Western Blot e, a partir disso, executaram o sequenciamento do gene DBT que evidenciou a mutação. Utilizando técnica

de transfecção em linfoblastos os pesquisadores observaram que o vetor contendo a mutação produziu uma proteína marcadamente truncada, sem atividade catalítica e que, sendo incapaz de formar a estrutura típica de E2, seria direcionada para degradação. Isso ocorre porque o sítio da mutação é anterior ao domínio interno principal da subunidade E2, responsável pelo agrupamento de subunidades E2 para a formação do núcleo cúbico do complexo enzimático (Fig. 49).

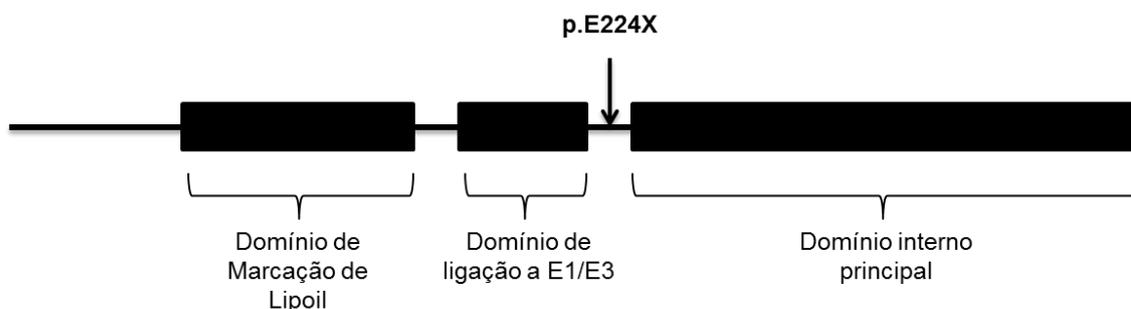


Figura 49: Domínios catalíticos da proteína E2. A seta representa o ponto de interrupção da proteína resultante da mutação c.670G>T (p.E224X).

Fonte: Adaptado de FISHER et al., 1993

A mesma mutação foi observada por esses autores em quatro pacientes com fenótipo clássico, de diversas etnias, tanto em heterozigose composta, quanto em homozigose. Três dos quatro pacientes identificados eram de etnia negra, mas os autores destacam a importância de se realizar outros estudos populacionais para averiguar a diferença de prevalência da mutação entre etnias.

5.3.5 Paciente 5

O estudo identificou que o paciente, filho de pais não consanguíneos, é heterozigoto composto para o gene DBT. Uma das mutações encontradas foi a transversão c.670G>T (p.E224X), a mesma observada no Paciente 4. Ambos os pacientes são naturais de municípios próximos, localizados no norte do estado de Minas Gerais distantes cerca de 130 km. Embora as famílias desconheçam parentesco, é possível supor que exista um ancestral comum próximo. No entanto, estudos com os genitores e a população seriam necessários para confirmar essa hipótese.

A outra mutação encontrada foi a deleção de um nucleotídeo no éxon 4 (c.261delA). Essa deleção resulta em mudança na matriz de leitura, causando a substituição de um aminoácido glutamato por lisina na posição 88 da proteína e, conseqüentemente, a criação de um códon de fim prematuro (TGA) a 38 códons do local da deleção (p.E88KfsX38). O resultado é uma proteína truncada, com apenas 124 resíduos, em comparação com os 482 da proteína original (Fig. 50 e 51).

```

ATTTCGGGGTAAGATGGCTGCAGTCCGTATGCTGAGAACCTGGAGCAGGAATGCGGGGAAGCTGATTTG
TGTTTCGCTATTTTCAAACATGTGGTAATGTTTCATGTTTTGAAGCCAAATTATGTGTGTTTCTTTGGTTAT
CCTTCATTCAAGTATAGTCATCCACATCACTTCCTGAAAACAACCTGCTGCTCTCCGTGGACAGGTTGTTTC
AGTTCAAGCTCTCAGACATTGGAGAAGGGATTAGAGAAGTAACTGTTAAAGAATGGTATGTAAGA...
  
```

Figura 50: Parte da sequência de cDNA do gene DBT. O códon destacado em amarelo representa o início da transcrição. Em vermelho está destacado o nucleotídeo deletado e em azul o primeiro códon a ser conseqüentemente modificado.

Fonte: NCBI, 2012

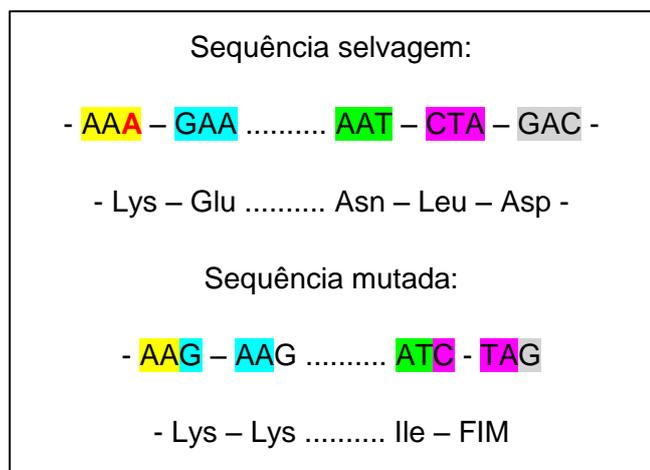


Figura 51: Resumo das alterações determinadas pela mutação c.261delA no cDNA e na proteína resultante. O nucleotídeo deletado está destacado em vermelho na sequência selvagem. A linha tracejada representa todos os códons alterados pela mudança da matriz de leitura até o novo códon de fim.

Fonte: NCBI, 2012

Não foi encontrada nenhuma descrição prévia dessa mutação na literatura (CARDIFF UNIVERSITY, 2011; NCBI, 2012). É de se supor, no entanto, que a mutação seja de fato patogênica, por dar origem a uma proteína sem função. Comparando a mutação

c.261delA a c.670G>T, cujo resultado foi testado experimentalmente por Fisher e colaboradores (1993), percebemos que a primeira resulta em uma proteína de menor tamanho e que, além de não possuir o domínio interno principal, também apresenta prejuízo do domínio de ligação a E1/E3 (Fig. 52). Essa hipótese, entretanto, necessita de confirmação experimental.

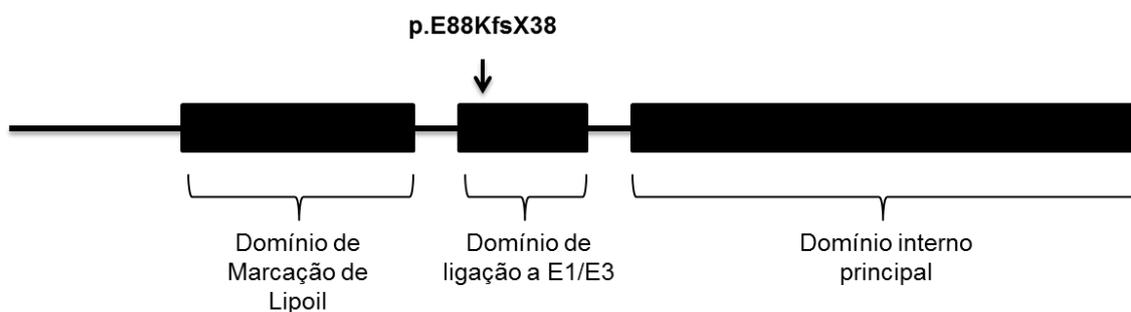


Figura 52: Domínios catalíticos da proteína E2. A seta representa o ponto de interrupção da proteína resultante da mutação c.261delA (p.E88KfsX38).

Fonte: Adaptado de FISHER et al., 1993

5.3.6 Paciente 6

Não foi encontrada nenhuma alteração nas sequências codificantes dos genes BCKDHA, BCKDHB ou DBT. No entanto, o sequenciamento das regiões intrônicas flangeadoras permitiu a identificação de uma transição no íntron 1 do gene BCKDHA (c.108+6T>C), presente em homozigose (Fig. 53). Os pais são consanguíneos, primos de 2º grau.

```
CTACGTGAGTGCCGGACCGCTGAGTGGTTGTTAGCCAAGATGGCGGTAGCGATCGCTGCAGCGAGGGTCT
GGCGGCTAAACCGTGGTTTTGAGCCAGGCTGCCCTCCTGCTGCTGCGGCAGCCTGGGGCTCGGGGACTGGC
TAGATCTgtgagtacctgggccccaggcggttttcccaaaggggattagggatgtaaaggcta...
```

Figura 53: Sequência de DNA dos éxon 1 e parte do íntron 1 do gene BCKDHA. As letras maiúsculas representam o éxon e as letras minúsculas a região intrônica. Em vermelho está destacado o nucleotídeo substituído.

Fonte: NCBI, 2012

A variação não se encontra descrita na literatura como mutação patogênica (CARDIFF UNIVERSITY, 2011) ou como polimorfismo (NCBI, 2012). A mutação envolve o nucleotídeo +6 do sítio doador de *splicing* 5', uma base com 47% de conservação entre as espécies de mamíferos (ANTONARAKIS e COOPER, 2010) (Fig. 54).

	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6
Consenso	A/C	A	G	g	t	a/g	a	g	t
E/I – 1	T	C	T	g	t	g	a	g	t
P6	T	C	T	g	t	g	a	g	c

Figura 54: Sequência de *splicing* da junção íntron e éxon do gene BCKDHA. Os nucleotídeos estão numerados de -3 (primeira base do éxon) a +6 (última base intrônica). As letras maiúsculas representam os nucleotídeos do éxon e as minúsculas os nucleotídeos intrônicos. Consenso representa a sequência de referência para o sítio doador de *splicing* (ANTONARAKIS e COOPER, 2010). E/I – 1 representa a sequência de referência para a junção do éxon 1 e íntron 1 do gene BCKDHA e P6 representa a mutação encontrada no Paciente 6, destacada em vermelho.

Cerca de 10% das mutações patogênicas são causadas por substituições de bases nos sítios de *splicing* (ANTONARAKIS e COOPER, 2010). Essas alterações podem levar ao salto do éxon ou ativação de um sítio de *splicing* críptico, tendo como consequência a criação de mRNA anômalos ou não funcionais, com códons de parada prematuros ou com inclusão de sequências intrônicas (FAUSTINO e COOPER, 2003).

As simulações em banco de dados de *splicing* são uma ferramenta de auxílio na predição de alterações de sequência consenso. A simulação da mutação em estudo no *software* NetGene2® (BRUNAK, ENGELBRECHT e KNUDSEN, 1991) resultou nos *outputs* representados nas figuras 55 e 56.

The sequence: BCKDHA has the following composition:
 Length: 27217 nucleotides.
 21.4% A, 26.0% C, 26.3% G, 26.3% T, 0.0% X, 52.3% G+C

Donor splice sites, direct strand

pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
148	0	+	0.41	GGCTAGATCT	GTGAGTACCT		
1275	0	+	0.34	GCCTGGATTG	GTGAGGCCCT		
1470	1	+	0.47	CTTGAACAG	GTAAATACAG		
1498	1	+	0.37	CAGGAGCAAG	GTGAGGTAG		
2326	0	+	0.36	CCAGGCTGGA	GTGAGTGCAG		
4112	0	+	0.79	TCTCCAAGTG	GTAGGTACTC		
4723	1	+	0.46	GCTCAGAGAG	GTGAGGTCTG		
4996	1	+	0.47	GGGACTACAG	GTGTGTGCCA		
5255	1	+	0.34	GCCTTTGTAG	GTATGAGGTC		
5904	1	+	0.63	ATCCTAGCTG	GTGAGGCATT		
6165	1	+	0.34	AAAATTTTAT	GTGAGTATT		
6949	2	+	0.47	GGGACTATAG	GTGCGTGCCA		
7195	1	+	0.47	GTGAAGCAAT	GTGAGTAAGA		
7642	2	+	0.34	GGGAGTACAG	GTGTGCACCA		
9704	2	+	0.45	AACTTCTAG	GTGAGTGTCT		
10102	0	+	0.32	GGCAGTTGGG	GTGAGGAGCA		
11305	0	+	0.31	GGGATTACAG	GTGTGCCCAA		
12717	1	+	0.34	CTCAGCCCT	GTGAGTCAGG		
13029	0	+	0.95	GGACCCCCAC	GTGAGAGCGG H		
13222	0	+	0.99	TCAGCGGCAG	GTGCGTGGGG H		
13530	1	+	0.37	GAGAAACAGG	GTGGGTCCCC		
14856	1	+	0.34	TCCCAAATG	GTAGGATTAT		
15306	1	+	0.41	ACTGTTGTTG	GTGAGTTGAC		
15558	1	+	0.36	TGAGGCTCAG	GTTAGGGGAT		
16366	0	+	0.19	GTACCGGGAG	GCAGGTACGT		
16370	1	+	1.00	CGGGAGGCAG	GTACGTCTGT H		
16374	2	+	0.06	AGGCAGGTAC	GTCTGTCCGT		
16378	0	+	0.06	AGGTACGTCT	GTCCGTGGTT		
16978	1	+	0.47	CCAGGGAGCA	GTGAGTGGGG		
17221	1	+	0.46	TCAGCACAGA	GTAAGCGCTC		
17707	1	+	0.54	ATGGTGCAGG	GTAAGGAGTT		
18539	1	+	0.47	GGCACCCGG	GTGAGGTTAG		
18640	0	+	0.66	TAAAGCCAG	GTAAGAACCT		

Figura 55: Predição dos sítios de *splicing* no gene BCKDHA não mutado. As numerações apresentadas na primeira coluna correspondem às junções éxon/íntron, iniciando-se no primeiro nucleotídeo do gene BCKDHA. Em vermelho está destacado o sítio de *splicing* alterado.

The sequence: BCKDHA has the following composition:
 Length: 27217 nucleotides.
 21.4% A, 26.0% C, 26.3% G, 26.3% T, 0.0% X, 52.3% G+C

Donor splice sites, direct strand

pos 5'→3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
1275	0	+	0.34	GCCTGGATTG	GTGAGGCCCT		
1470	1	+	0.47	CTTGAACAG	GTAAATACAG		
1498	1	+	0.37	CAGGAGCAAG	GTGAGGTAG		
2326	0	+	0.36	CCAGGCTGGA	GTGAGTGCAG		
4112	0	+	0.79	TCTCCAAGTG	GTAGGTACTC		
4723	1	+	0.46	GCTCAGAGAG	GTGAGGTCTG		
4996	1	+	0.47	GGGACTACAG	GTGTGTGCCA		
5255	1	+	0.34	GCCTTTGTAG	GTATGAGGTC		
5904	1	+	0.63	ATCCTAGCTG	GTGAGGCATT		
6165	1	+	0.34	AAAATTTTAT	GTGAGTATT		
6949	2	+	0.47	GGGACTATAG	GTGCGTGCCA		
7195	1	+	0.47	GTGAAGCAAT	GTGAGTAAGA		
7642	2	+	0.34	GGGAGTACAG	GTGTGCACCA		
9704	2	+	0.45	AACTTCTAG	GTGAGTGTCT		
10102	0	+	0.32	GGCAGTTGGG	GTGAGGAGCA		
11305	0	+	0.31	GGGATTACAG	GTGTGCCCAA		
12717	1	+	0.34	CTCAGCCCT	GTGAGTCAGG		
13029	0	+	0.95	GGACCCCCAC	GTGAGAGCGG H		
13222	0	+	0.99	TCAGCGGCAG	GTGCGTGGGG H		
13530	1	+	0.37	GAGAAACAGG	GTGGGTCCCC		
14856	1	+	0.34	TCCCAAATG	GTAGGATTAT		
15306	1	+	0.41	ACTGTTGTTG	GTGAGTTGAC		
15558	1	+	0.36	TGAGGCTCAG	GTTAGGGGAT		
16366	0	+	0.19	GTACCGGGAG	GCAGGTACGT		
16370	1	+	1.00	CGGGAGGCAG	GTACGTCTGT H		
16374	2	+	0.06	AGGCAGGTAC	GTCTGTCCGT		
16378	0	+	0.06	AGGTACGTCT	GTCCGTGGTT		
16978	1	+	0.47	CCAGGGAGCA	GTGAGTGGGG		
17221	1	+	0.46	TCAGCACAGA	GTAAGCGCTC		
17707	1	+	0.54	ATGGTGCAGG	GTAAGGAGTT		
18539	1	+	0.47	GGCACCCGG	GTGAGGTTAG		
18640	0	+	0.66	TAAAGCCAG	GTAAGAACCT		
18662	1	+	0.63	GTCAACAAAG	GTGAGTCAAT		

Figura 56: Predição dos sítios de *splicing* no gene BCKDHA com a mutação c.108+6T>C, descrita no Paciente 6. Em vermelho estão destacadas todas as possíveis seqüências de *splicing* preditas no íntron 1.

Os resultados da simulação mostram que a alteração provavelmente resulta na não ocorrência do *splicing* na junção entre éxon 1 e íntron 1, que anteriormente à mutação ocorreria com 41% de confiança e manutenção do *splicing* entre éxons 2 e íntron 2, na posição 13.029. Nesse caso a consequência seria a inclusão de uma sequência intrônica de 12.701 nucleotídeos no mRNA final e esse seria, provavelmente, não funcional. A criação de um sítio de *splicing* críptico no íntron 1 é também uma possibilidade uma vez que o *software* encontrou 17 regiões semelhantes a sequências consenso nessa região. O deslocamento do sítio de *splicing* geraria a inclusão da porção anterior desse íntron no mRNA, podendo igualmente explicar a perda de função da proteína.

Esses achados sugerem que a mutação pode levar a um erro de *splicing* e, portanto, ser responsável pelo quadro clínico de MSUD apresentado pelo paciente, embora sejam necessários mais estudos para a confirmação dessa hipótese. Tal pesquisa é dificultada pelo fato de que a paciente foi a óbito no ano de 2011, antes do início deste estudo.

5.3.7 Considerações gerais

O sequenciamento dos três genes relacionados com o quadro clínico de MSUD foi capaz de identificar alterações potencialmente patogênicas em todos os pacientes estudados. A pesquisa poderia, ainda, ser complementada com a confirmação dos achados moleculares por meio do estudo dessas mutações nos genitores, verificando a presença de mutações herdadas ou *de novo* e contribuindo para o adequado aconselhamento genético dessas famílias. A expressão e caracterização dos mRNAs por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e sequenciamento de cDNA, além de ensaio de atividade enzimática em fibroblastos para a análise das proteínas, poderiam também confirmar a patogenicidade das mutações descritas e elucidar se essas alterações levam à degradação dos mRNAs mutados ou formação de proteína com atividade catalítica limitada. As alterações moleculares descritas nas seções anteriores estão resumidas no quadro 8.

Quadro 8 – Resumo das alterações moleculares encontradas nos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT dos pacientes com MSUD

Gene	DNA	Proteína	Tipo de mutação	Paciente	Apresentação
BCKDHA	c.108+6T>C	-	<i>Splicing</i>	P6 ^a	Homozigose
BCKDHB	c.359T>C	p.F120S	Sentido trocado	P3	Heterozigose
	c.595_596delAG	p.P200X	Pequena deleção	P1 ^a	Homozigose
	c.1159C>T	p.R387X	Sem sentido	P3	Heterozigose
DBT	c.261delA	p.E88KfsX38	Pequena deleção	P5	Heterozigose
	c.670G>T	p.E224X	Sem sentido	P4 ^a P5	Homozigose Heterozigose
	c.1193T>C	p.L398P	Sentido trocado	P2	Homozigose

^a Filho de pais consanguíneos.

Das sete mutações encontradas neste estudo, apenas três estavam previamente descritas na literatura. É possível observar que existe uma diversidade grande de mutações, que parecem ser restritas a cada família, havendo apenas um caso de mutação em comum entre pacientes residentes da mesma região. Quanto às mutações já descritas em populações europeias e norte-americanas não foi possível estabelecer relações de descendência para todos os casos, pois alguns pais tinham pouco conhecimento a respeito da origem de suas famílias. A presença de homozigose foi condizente com o relato de consanguinidade entre os pais, exceto no caso do Paciente 2, para o qual existe suspeita de consanguinidade não conhecida ou não relatada. Quanto aos tipos de mutação, a substituição de um único par de bases, em especial a transição, foi o mecanismo mais comum, achado que é condizente com dados da literatura (ANTONARAKIS e COOPER, 2010). Não parece haver correlação entre o gene mutado ou o tipo de mutação e o fenótipo clínico da doença.

- De um modo geral, o diagnóstico de pacientes com MSUD no estado de Minas Gerais é tardio e, como já descrito na literatura, isto está diretamente relacionado com o atraso observado no crescimento e desenvolvimento.
- O estabelecimento de intervalos de referência para aminoácidos séricos e influxo cerebral de aminoácidos permitiu a identificação de valores aumentados de AACR, bem como de deficiências de diversos aminoácidos nos pacientes em tratamento dietético. As altas concentrações séricas de leucina e de isoleucina estão associadas com a deficiência de alanina. As deficiências de serotonina e catecolaminas no sistema nervoso central devem ser tratadas por meio de reposição nutricional dos aminoácidos deficientes.
- A aplicação de um método de inquérito alimentar mais fidedigno, como o registro alimentar de 72 horas, é necessária para adequada estimativa de ingestão de aminoácidos dos pacientes.
- No estudo molecular desses pacientes verificamos, além da heterogeneidade de *locus*, grande heterogeneidade alélica. Não houve correlação aparente entre genótipo e fenótipo, já que a gravidade do atraso de desenvolvimento esteve relacionada com a demora do diagnóstico e tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, P.B.; YANNICELLI, S. Maple Syrup Urine Disease. In.: ACOSTA, P.B.; YANNICELLI, S.. *Nutrition Support Protocols*, 4ª Ed., The Ross Metabolic Formula System, 2001, p. 75 – 103.

ADZHUBEI, I.A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, v.7, n.4, p. 248 – 249, 2010.

ALENINA, N. et al. Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, n. 25, p. 10332 – 10337, 2009.

ANTONARAKIS, S.E.; COOPER, D.N. Human Gene Mutation: Mechanisms and Consequences. In.: SPEICHER, M.R. et al. *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches*. 4ª ed., Ed. Springer-Verlag, 2010, p. 319 – 363.

ANTHONY, T.G.; MORRISON, C.D.; GETTYS, T.W. Remodeling of lipid metabolism by dietary restriction of essential amino acids. *Diabetes*, v. 62, n. 8, p. 2635-2644, 2013.

ARAÚJO, A.P.Q.C. Psychiatric features of metabolic disorders. *Rev Psiq Clin*, v. 31, n. 6, p. 285 – 289, 2004.

ARMSTRONG, M.; JONSCHER, K.; REISDORPH, N.A. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, v. 21, n. 16, p. 2717 – 2726, 2007.

BASHYAM, M.D. et al. Molecular genetic analysis of MSUD from India reveals mutations causing altered protein truncation affecting the C-termini of E1 α and E1 β . *J Cell Biochem*, v. 113, n. 10, p. 3122 – 3132, 2012.

BEN-OMRAN, T.I. et al. Atypical phenotype in a boy with a maple syrup urine disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, v. 29, n. 1, p. 195 – 200, 2006.

BERRY, G.T. et al. Branched-chain amino acid free parenteral nutrition in the treatment of acute metabolic decompensation in patients with maple syrup urine disease. *N Engl J Med*, v. 324, n. 3, p. 175 – 179, 1991.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN: orientações básicas para a coleta, o processamento, a análise de dados e a informação em serviços de saúde*. 1ª ed. Série A. Normas e Manuais Técnicos, Brasília, 2004, 123p.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Tabela Brasileira de Composição de alimentos – TACO*. 4ªed., Campinas – NEPA UNICAMP, São Paulo, 2011, 161p.

BREMER, H.J. et al. *Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis*. Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1981, 525p.

BRUNAK, S.; ENGELBRECHT, J.; KNUDSEN, S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol*, v. 220, n. 1, p. 49 – 65, 1991.

BUENO; A.L.; CZEPIELEWSKI, M.A. O recordatório de 24 horas como instrumento na avaliação do consumo alimentar de cálcio, fósforo e vitamina D em crianças e adolescentes de baixa estatura. *Rev Nutr*, v. 23, n. 1, p. 65 – 73, 2010.

BUSE, M.G. et al. Oxidation of branched chain amino acids by isolated hearts and diaphragms of the rat. The effect of fatty acids, glucose and pyruvate respiration. *J Biol Chem*, v. 247, n. 24, p. 8085-8096, 1972.

BUZZARD, M. 24-hours dietary recall and food record methods. In: WILLETT, W.C. *Nutritional Epidemiology*. 2ª ed. Oxford: Oxford University Press, 1998, p. 50 – 73.

CABRAL, A. et al. Doenças dos aminoácidos de cadeia ramificada. *Acta Med Port*, v. 11, n. 7, p. 659 – 665, 1998.

CAPPUCCINO, C.C.; KADOWAKI, H.; KNOX, W.E. Assay of leucine aminotransferase in rat tissues and tumors. *Enzyme*, v. 23, n. 5, p. 328 – 338, 1978.

CARDIFF UNIVERSITY, Institute of Medical Genetic in Cardiff. The Human Gene Mutation Database (HGMD), 2011. Disponível em: <http://hgmdtrial.biobase-international.com/hgmd/pro/trial.php>.

CARVALHO, A.M. et al. Avaliação do Desenvolvimento. In.: LEÃO, L. et al. (Eds.) *Pediatria Ambulatorial*, 5ª ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2013, p. 213 – 235.

CEDERBAUM, S.D.; STEPHEN, D. New frontiers in hereditary metabolic disease: an historical perspective. *Mol Genet Metab*, v. 87, n. 3, p. 184 – 189, 2006.

CHACE, D.H. et al. Rapid diagnosis of maple syrup urine disease in blood spots from newborns by tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, v. 41, n. 1, p. 62 – 68, 1995.

CHEN, Y-T; CORNBATH, M.; SIDBURY, J.B. Cornstarch therapy in type I glycogen-storage disease. *N Engl J Med*, v. 310, n.3, p. 171 – 175, 1984.

CHUANG, D.T.; COX, R.P. Enzyme assays with mutante cell lines of maple syrup urine disease. *Methods Enzymol*, v. 166, p. 135 – 146, 1988.

CHUANG, J.L. et al. Molecular and biochemical basis of intermediate maple syrup urine disease. Occurrence of homozygous G245R and F364C mutations at the E1 alpha locus of Hispanic-Mexican patients. *J Clin Invest*, v. 95, n. 3, p. 954 – 963, 1995.

CHUANG, D.T.; SHIH, V.E. Disorders of Branched Chain Amino Acid and Keto Acid Metabolism. In: SCRIVER, C. H. et al. (Eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8ª ed. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 1971 – 1995.

CHUANG, J.L. et al. Structural and biochemical basis for novel mutations in homozygous Israeli maple syrup urine disease patients: a proposed mechanism for the thiamin-responsive phenotype. *J Biol Chem*, v. 279, n. 17, p. 17792 – 17800, 2004.

CHUANG, D.T.; CHUANG, L.J.; WYNN, M.R. Lessons from Genetic Disorders of Branched-Chain Amino Acid Metabolism. *J Nutr*, v. 136, n. 1, p. 243 – 249, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition* CLSI document C28-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA, 2008.

DANCIS, J.; HUTZLER, J.; LEVITZ, M. Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. *Biochim Biophys Acta*, v. 43, p. 342 – 343, 1960.

DE ONIS, M. et al. Development of WHO reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ*, v. 85, p. 660 – 667, 2007.

DEPASQUALE, M.; PATLAK, C.S.; CSERR, H.F. Brain ion and volume regulation during acute hypernatremia in Brattleboro rats. *Am J Physiol*, v. 256, n. 6, p. 1059 – 1066, 1989.

DIGEORGE, A.M. et al. Prospective study of maple-syrup-urine disease for the first four days of life. *New Eng J Med*, v. 307, p.1492 – 1495, 1982.

EL HUSNY, A.S.; FERNANDES-CALDATO, M.C. Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura. *Rev Para Med*, v. 20, n. 2, p. 41 – 45, 2006.

FAUSTINO, N.A.; COOPER, T.A. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, v. 17, n. 4, p. 419 – 437, 2003.

FISHER, C.W. et al. Occurrence of a 2-bp (AT) Deletion Allele and a Nonsense (G-to-T) Mutant Allele at the E2 (DBT) Locus of Six Patients with Maple Syrup Urine Disease: Multiple-Exon Skipping as a Secondary Effect of the Mutations. *Am J Hum Genet*, v. 52, n. 2, p. 414 – 424, 1993.

FISCHER, M.H.; GERRITSEN, T. Biochemical studies on a variant of branched chain ketoaciduria in a 19-year-old female. *Pediatrics*, v. 48, n. 5, p. 795 – 801, 1971.

FRAGA, J.M.; ALONSO-FERNANDEZ, J.R. Neonatal screening programmes in Spain: 1982–1986. In.: THERRELL, B.L. (Ed), *Advances in Neonatal Screening*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987, p. 487–488.

GARROD, A.E. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet*, v. 2, p. 1616 – 1620, 1902.

GEFFRÉ, A.; CONCORDET, D.; BRAUN, J.P.; TRUMEL, C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol.*, v. 40, n. 1, p. 107 – 112, 2011.

GOLDBERG, A.L.; CHANG, T.W. Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. *Fed Proc*, v. 37, n. 9, p. 2301 – 2307, 1978.

GREGORY, D.M.; SOVETTS, D.; CLOW, C.L.; SCRIVER, C.R. Plasma free amino acid values in normal children and adolescents. *Metabolism*, v. 35, n. 10, p. 967 – 969, 1986.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Integration of renal mechanisms for control of blood volume and extracellular fluid volume. In.: GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Textbook of Medical Physiology*, 9^{ed}. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996.

HALL, T.R. Branched-chain aminotransferase isoenzymes. Purification and characterization of the rat brain isoenzyme. *J Biol Chem*, v. 268, n. 5, p. 3092 – 3098, 1993.

HARPER, A.E.; MILLER, R.H.; BLOCK, K.P. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr*, v. 4, p. 409 – 454, 1984.

HARRIS, D.C. *Análise Química Quantitativa*. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005, 876 p.

HENNEKE, M. et al. Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease. *Hum Mutat*, v. 22, n. 5, p. 417 – 423, 2003.

HERBER, S. *Doença da Urina do Xarope de Bordo no Brasil: um panorama das duas últimas décadas*. 2012. 87p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre.

HERTZ, L.; CHEN, Y.; SPATZ, M. Involvement of non-neuronal brains cells in AVP-mediated regulation of water space at cellular, organ and whole-body level. *J Neurosci Res*, v. 62, n. 4, p. 480 – 490, 2000.

HEYWARD, V. H. ASEP Methods recommendation: body composition assessment. *J Exerc Physiol Online*, v. 4, n. 4, p. 1 – 12, 2001.

HORN, P.S.; PESCE, A.J.; COPELAND, B.E. A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clin Chem*, v. 44, n. 3, p. 622 – 631, 1998.

HUTSON, S.M.; RANNELS, S.L. Characterization of a mitochondrial transport system for branched chain alpha-keto acids. *J Biol Chem*, v. 260, n. 26, p. 14189 – 14193, 1985.

ICHIHARA, A.; NODA, C.; OGAWA, K. Control of leucine metabolism with special reference to branched-chain amino acid transaminase isozymes. *Adv Enzyme Regul*, v. 11, p. 155 – 166, 1973.

ICHIHARA, A. Isozyme patterns of branched chain amino acid transaminase during cellular differentiation and carcinogenesis. In: Markert, C.L. *Isozymes III, Developmental Biology*. New York: Academic, 1975, p. 875- 889.

JARDIM, B.L.; ASHTON-PROLLA, P. Erros inatos do metabolismo em crianças e recém nascidos agudamente enfermos: guia para o seu diagnóstico e manejo. *J Pediatr*, v. 72, n. 2, p. 63 – 70, 1996.

JIMENEZ-SANCHEZ, G.; CHILDS, B.; VALLE, D. The effect of mendelian disease on human health. In: SCRIVER, C. H. et al. (Eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8ª ed. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 67 – 174.

JINNO, Y.; AKABOSHI, I.; MATSUDA, I. Complementation analysis in lymphoid cells from five patients with different forms of maple syrup urine disease. *Hum Genet*, v. 68, n. 1, p. 54 – 56, 1984.

KALSNER, L.R. et al. Tyrosine supplementation in phenylketonuria: Diurnal blood tyrosine levels and presumptive brain influx of tyrosine and other large neutral amino acids. *J Pediatr*, v. 139, n. 3, p. 421 – 427, 2001.

KAPLAN, P. et al. Intellectual outcome in children with maple syrup urine disease. *J Pediatr*, v. 119, n. 1, p. 46 – 50, 1991.

KOREIN, J. et al. Maple syrup urine disease: clinical, EEG, and plasma amino acid correlations with a theoretical mechanism of acute neurotoxicity. *Int J Neurosci*, v. 79, n. 1, p. 21 – 45, 1994.

KRAWCZAK, M. ; BALL, E.V.; COOPER, D.N. Neighboring-nucleotide effects on the rates of germ-line single-base-pair substitution in human genes. *Am J Hum Genet.*, v. 63, n. 2, p. 474 – 488, 1998.

KROLL, M.; JUHLER, M.; LINDHOLM, J. Hyponatraemia in acute brain disease. *J Intern Med*, v. 232, n. 4, p. 291 – 97, 1992.

LANCASTER, G. et al. Quantitative analysis of branched-chain alpha-keto acids as their trimethylsilylated oximes. *Clin Chim Acta*, v. 48, n. 3, p. 279 – 285, 1973.

LANOUE, K.F.; SCHOOLWERTH, A.C. Metabolite transport in mitochondria. *Annu Rev Biochem*, v. 48, p. 871 – 922, 1979.

LEPAGE, N.; MCDONALD, N.; DALLAIRE, L.; LAMBERT, M. Age-specific distribution of plasma amino acid concentrations in a healthy pediatric population. *Clin Chem*, v. 43, n. 12, p. 2397 – 2402, 1997.

LINDROTH, P.; HAMBERGER, A.; SANDBERG, M. Liquid Chromatographic Determination of Amino Acids After Precolumn Fluorescence Derivatization. In.: LAN A. BOULTON, I.A.; BAKER, G.B.; WOOD. J.P. *Amino Acids (Neuromethods)* v. 3, 1986, p. 97-116.

LIU, H. Measurement of Blood Plasma Amino Acids in Ultrafiltrates by High-Performance Liquid Chromatography with Automatic Precolumn O-Phthaldialdehyde Derivatization. In: COOPER, C. (Ed.). *Amino Acid Analysis Protocols (Methods in Molecular Biology)*. New Jersey: Humana Press Inc, 2001, p. 123 – 140.

LIU, H.; SAÑUDA-PEÑA, MC.; HARVEY-WHITE, J.D.; KALRA, S.; COHEN, S.A.J. Determination of submicromolar concentrations of neurotransmitter amino acids by fluorescence detection using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate method for amino acid analysis. *Chromatogr A*, v. 828, n. 1, p. 383 – 395, 1998.

LOVE-GREGORY, L.D. et al. Evidence of Common Ancestry for the Maple Syrup Urine Disease (MSUD) Y438N Allele in Non-Mennonite MSUD Patients, *Mol Genet Metab*, v. 75, n. 1, p. 79 – 90, 2002.

MARTINS, A.M. *Erros Inatos do Metabolismo: Abordagem Clínica*. 2ª ed., São Paulo, 2003.

MATALON, R. et al. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis*, v. 29, n. 6, p. 732 – 738, 2006.

MATUDA, S. et al. Pyruvate dehydrogenase subcomplex with lipoamide dehydrogenase deficiency in a patient with lactic acidosis and branched chain ketoaciduria. *Clin Chim Acta*, v. 140, n. 1, p. 59 – 64, 1984.

MAZARIEGOS, G.V. et al. Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long term follow-up in 37 patients and comparative United Network for Organ Sharing experience. *J Pediatr*, v. 160, n. 1, p. 116 – 121, 2011.

MENKES, J.; HURTT, P.; CRAIG, J.M. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics*, v. 14, n. 5, p. 462 – 467, 1954.

MENKES, J. H. Maple syrup disease: isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics*, v. 23, n. 2, p. 348 – 353, 1959.

MITSUBUCHI, H.; OWADA, M.; ENDO, F. Markers associated with inborn errors of metabolism of branched-chain amino acids and their relevance to upper levels of intake in healthy people: an implication from clinical and molecular investigations on maple syrup urine disease. *J Nutr*, v. 135, n. 6, p. 1565 – 1570, 2005.

MOLNÁR-PERL, I. Advancement in the derivatizations of the amino groups with the o-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride reagents. *J Chromat B*, v. 879, n. 17 – 18, p. 1241 – 1269, 2011.

MORTON, D.H. et al. Diagnosis and treatment of maple syrup urine disease: a study of 36 patients. *Pediatrics*, v. 109, n. 6, p. 999 – 1008, 2002.

MULLER, H. Maple syrup urine disease with an intermittent relatively benign course. *Dtsch Med Wochenschr*, v. 96, n. 40, p. 1552 – 1557, 1971.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. NCBI. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

NELHAUS, G. Head circumference from birth to eighteen years. Practical international and interracial graphs. *Pediatrics*, v. 41, p. 106 – 114, 1968.

NELLIS, M.N. et al. Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression. *Mol Genet Metab*, v. 80, n. 1, p. 189 – 195, 2003.

NORD, A.; VAN DOORNINCK, W.J.; GREENE, C. Developmental profile of patients with maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis*, v. 14, n. 6, p. 881 – 889, 1991.

NORTON, P.M. et al. A new finding in maple syrup urine disease. *Lancet*. v. 1, n. 7219, p. 26 – 27, 1962.

OLIVER, R.M.; REED, L.J. Multienzyme complexes. In.: HARRIS, J.R. *Electron Microscopy of proteins*. London, Academic, v. 2, 1982, p. 1 – 48.

PETROSKI, E. L. *Antropometria: Técnicas e Padronizações*, 2ª ed. Porto Alegre: Palotti, 2003, 280p.

PETTIT, F.H.; YEAMAN, S.J.; REED, L.J. Purification and characterization of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex of bovine kidney. *Proc Natl Acad Sci*, v. 75, n. 10, p. 4881 – 4885, 1978.

PINHEIRO, A. B. V. et al. *Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras*. 5ª Ed, Editora Atheneu, São Paulo, 2005, 131p.

PRASAD, C.; DALTON, L.; LEVY, H. Role of diet therapy in management of hereditary metabolic diseases. *Nutr Res*, v. 18, p. 391 – 402, 1998.

PROTEIN DATA BANK. PDB. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/protein/P21953>

PUCKETT, R.L. et al. Maple syrup urine disease: further evidence that newborn screening may fail to identify variant forms. *Mol Genet Metab*, v. 100, n. 2, p. 132 – 142, 2010.

QUENTAL, S. et al. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol Genet Metab*, v. 94, n. 2, p. 148 – 156, 2008.

QUENTAL, S. et al. Incidence of maple syrup urine disease in Portugal. *Mol Genet Metab*, v. 100, n. 4, p. 385 – 387, 2010.

RIEMENSPERGER, T. et al. Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 108, n. 2, p. 834 – 839, 2011.

REED, A.H.; HENRY, R.J.; MASON, W.B. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem*, v. 17, p.275 – 284, 1971.

REED, L.J.; DAMUNI, Z.; MERRYFIELD, M.L. Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain α -keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr Top Cell Regul*, v. 27, p. 41 – 49, 1985.

REVERTER, M.; LUNDH, T.; LINDBERG, J.E. Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-*N*-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, v. 696, n. 1, p. 1 – 8, 1997.

ROBINSON, B.H. et al. Lactic acidemia, neurologic deterioration and carbohydrate dependence in a girl with dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *Eur J Pediatr*, v. 136, n. 1, p. 35 – 39, 1981.

RODRIGUES, C.A.F. *Leucínose*. 2002. 55p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Porto, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Porto.

SANSEVERINO, M.T.V.; WAJNER, M.; GIUGLIANI, R. Aplicação de um protocolo clínico-laboratorial para identificação de erros inatos do metabolismo em crianças gravemente enfermas. *J Pediatr*, v. 76, n. 5, p. 375 – 382, 2000.

SARFARAZ, D.; FRASER, C.L. Effects of arginine vasopressin on cell volume regulation in brains astrocyte in culture. *Am J Physiol*, v. 276, n. 3, p. 596 – 601, 1999.

SAUDUBRAY, J.M.; CHARPENTIER, C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: SCRIVER, C. H. et al. (Eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7^a ed. New York: McGraw-Hill, 1995, p.327 – 400.

SAUDUBRAY, J.M.; SEDEL, F.; WALTER, J.H. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: An introduction. *J Inherit Metab Dis*, v. 29, n. 2, p. 261 – 274, 2006.

SCHADEWALDT, P.; WENDEL, U. Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr*, v. 156, n. 1, p. 62 – 66, 1997.

SCHADEWALDT, P. et al. Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. *Clin Chem*, v. 45, n. 10, p. 1734 – 1740, 1999.

SCHONBERGER, S. et al. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. *Mol Genet Metab*, v. 82, n. 1, p. 69 – 75, 2004.

SCRIVER, C.R.; GREGORY, D.M.; SOVETTS, D.; TISSENBAUM, G. Normal plasma free amino acid values in adults: the influence is some common physiological variables. *Metabolism.*, v. 34, n. 9, p. 868 – 873, 1985.

SHAPIRA, E. et al. (Eds.) *Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. 1ª ed. Oxford: Oxford University Press, 1989, 160p.

SHIH, V.E. Amino Acids Analysis. In.: BLAU, N. et al. (Eds.) *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. 2ª ed. New York: Springer, 2003, p. 11 – 26.

SIMON, E. et al. Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inherit Metab Dis*, v. 29, n. 4, p. 532 – 537, 2006.

SIMONS, S.S.; JOHNSON, D.F. The structure of the fluorescent adduct formed in the reaction of o-phthalaldehyde and thiols with amines. *J Am Chem Soc*, v. 98, p.7098 – 7099, 1976.

SKOOG, D.A.; JAMES, H.F.; STANLEY, R.C. *Princípios de análise instrumental*. 5ª ed. Ed. Bookman, 2002, 1056p.

SMITH, Q.R. et al. Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J Neurochem*, v. 49, n. 5, p. 1651 – 1658, 1987.

SMITH, Q.R.; STOLL, J.S.; Blood-brain barrier amino acid transport, In: PARDRIDGE, W.M. (Ed.), *Introduction to the Blood-Brain Barrier*, Cambridge: Cambridge University Press, 1998, p. 188–197.

SNYDERMAN, S.E. Maple syrup urine disease, with particular reference to dietotherapy. *Pediatrics*, v. 34, p. 454 – 472, 1964.

SNYDERMAN, S.E. Treatment outcome of maple syrup urine disease. *Acta Paediatr Jpn*, v. 30, n. 4, p. 417 – 424, 1988.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA (SBP). *Avaliação nutricional da criança e do adolescente – Manual de Orientação/Sociedade Brasileira de Pediatria*. Departamento de Nutrologia. – São Paulo: Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia, 2009. 112 p.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE DOENÇAS METABÓLICAS (SPDM). Consenso para o tratamento nutricional da leucínose. *Acta Paediatr Port*, v. 38, n. 3, p. 120 – 128, 2007.

SOUZA, I.C.N. Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento. 2002. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

STRAUSS, K.A.; PUFFENBERGER, E.G.; MORTON, D.H. Maple Syrup Urine Disease, 2006 In: PAGON, R.A. et al. (Eds.) *GeneReviews*, Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1319/>.

STRAUSS, K.A.; MORTON, D.H. Branched-chain Ketoacyl Dehydrogenase Deficiency: Maple Syrup Disease. *Curr Treat Options Neurol*, v. 5, n. 4, p. 329 – 341, 2003.

STRAUSS, K.A. et al. Elective liver transplantation for the treatment of classical maple syrup urine disease. *Am J Transplant*, v. 6, n. 3, p. 557 – 564, 2006.

STRAUSS, K.A. et al. Classical Maple Syrup Urine Disease and brain development: Principles of management and formula design. *Mol Genet Metab*, v.99, n. 4, p. 333 – 345, 2010.

TAYLOR, R.T.; JENKINS, W.T. Leucine aminotransferase. II. Purification and characterization. *J Biol Chem*, v. 241, n. 19, p. 4396 – 4405, 1966.

THOMPSON, G.N.; FRANCIS, D.E.; HALLIDAY, D. Acute illness in maple syrup urine disease: dynamics of protein metabolism and implications for management. *J Pediatr*, v. 119, n. 1, p. 35 – 42, 1991.

TRULSON, M.E.; JACOBS, B.L. Dose-response relationships between systemically administered L-tryptophan or L-5-hydroxytryptophan and raphe unit activity in the rat. *Neuropharmacology*, v. 15, n. 6, p. 339 – 344, 1976.

VALADARES, E.R.; OLIVEIRA, J.S.; TÁLAMO, L.E.P. Tratamento metabólico da doença da urina do xarope de bordo. *Rev Med Minas Gerais*, v. 20. n. 2, p. 255 – 258, 2010.

VASCONCELOS, F.A.G. *Avaliação Nutricional de Coletividades*, 4ª ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 2007, 186p.

VILLAR, B.S. Desenvolvimento e validação de um questionário semi-quantitativo de frequência alimentar para adolescentes. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo.

VITOLLO, M.R. Avaliação nutricional da criança. In.: VITOLLO, M.R. *Nutrição da gestação ao envelhecimento*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Rubio, 2008, p. 171 – 189.

WAIDER, J. et al. Tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) in disorders of cognitive control and emotion regulation: a perspective. *Psychoneuroendocrinology*, v. 36, n. 3, p. 393 – 405, 2011.

WANDERS, R.J.A.; DURAN, M.; LOUPATY, F.J. Enzymology of the branched-chain amino acid oxidation disorders: the valine pathway. *J Inheret Metab Dis*, v. 35, n.1, p. 5 – 12, 2012.

WELEY, V.R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 4ª ed. John Wiley and Sons, 2004, 412 p.

WESTALL, R.G; DANCIS, J.; MILLER, S. Maple Syrup Urine Disease. *Am J Dis Child*, v. 94, p. 571 – 572, 1957.

WHITE, P. C. Recent developments in detection techniques for high-performance liquid chromatography. Part I. Spectroscopic and electrochemical detectors. A review. *Analyst*, v. 109, n. 6, p. 677 – 697, 1984.

WILLETT, W.C. *Nutritional epidemiology*. 2ª ed. Oxford: Oxford University Press, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Enrollment and baseline characteristics in the WHO Multicenter Growth Reference Study. *Acta Paediatr*, v. 450, p. 7 – 15, 2006a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multicenter Growth Reference Study Group. Assessment of differences in linear growth among populations in the WHO Multicenter Growth Reference Study. *Acta Paediatr*, v. 450, p. 56 – 95, 2006b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Child Growth Standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: methods and development*. Geneva: WHO Department of Nutrition and Health Development, 2006c.

YOUNG, S.N. Behavioral effects of dietary neurotransmitter precursors: basic and clinical aspects. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 20, n. 2, p. 313 – 323, 1996.

YOUNG, S.N.; GAUTHIER, A.M. Effect of tryptophan administration on tryptophan, 5-hydroxyindoleacetic acid and indoleacetic acid in human lumbar and cisternal cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 44, n. 4, p. 323 – 327, 1981.

YUDKOFF, M. et al. Brain Amino Acid Requirements and Toxicity: The Example of Leucine. *J Nutr*, v. 135, n. 6, p.1531 – 1538, 2005.

ZINNANTI, W.J. et al. Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain*, v. 132, p. 903 – 918, 2009.

ZOPPA, M. et al. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Biomed Life Sci*, v. 831, n. 1, p. 267 – 273, 2006.

Anexo 1



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 08169212.2.0000.5149

**Interessado(a): Profa. Eugênia Ribeiro Valadares
Departamento de Propedêutica Complementar
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 11 de dezembro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação genética, clínica, nutricional e do neurodesenvolvimento de pacientes com leucínose**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. T. Marques Amaral', is positioned above the name of the signatory.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

Anexo 2



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão

Belo Horizonte, 27 de dezembro de 2012.

PROCESSO: Nº 131/12 “AVALIAÇÃO GENÉTICA, CLÍNICA, NUTRICIONAL E DO NEURODESENVOLVIMENTO DE PACIENTES COM LEUCINOSE”

SR(A) PESQUISADOR(A):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 11/12/2012, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE **relatório** parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

PROF.ª ANDRÉA MARIA SILVEIRA
Diretora da DEPE/HC-UFMG

À Sr.ª.
Prof.ª Eugênia Ribeiro Valadares
Dpto. Propedêutica Complementar
Faculdade de Medicina- UFMG

Apêndice 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CASO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (HC-UFG)

Pesquisa: Avaliação genética, clínica, nutricional e do neurodesenvolvimento de pacientes com Leucínose

Pesquisador: Ana Facury da Cruz

Coordenador: Eugênia Ribeiro Valadares

Comitê de Ética em Pesquisa da UFG: Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – SL 2005 – CEP: 31.270-901 – BH/MG – Tel: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4516 – e-mail: prpq@coep.ufmg.br

Prezado(a) Senhor(a),

Seu filho está sendo convidado a participar de uma pesquisa de Mestrado intitulada “**Avaliação genética, clínica, nutricional e do neurodesenvolvimento de pacientes com Leucínose**”, realizada pela Faculdade de Medicina da UFG.

Sabemos que as crianças com Leucínose (Doença do Xarope de Bordo) precisam de controle clínico e nutricional periódico e de exame de aminoácidos no sangue para ajuste da dieta especial. Para essa pesquisa, portanto, serão utilizados dados coletados durante o atendimento clínico dos pacientes, como consumo alimentar, peso e estatura, que poderão ser complementados com dados de prontuário. A duração da pesquisa será de um ano, quando serão realizadas consultas mensais no Ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo (HC-UFG), com presença de médico e nutricionista e coleta de sangue em papel filtro e em tubo de EDTA para análise de aminoácidos no sangue. As amostras serão descartadas após o período de um ano, sendo utilizadas apenas para essa pesquisa, sendo dosadas por duas técnicas diferentes no Laboratório Hermes Pardini e posteriormente no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo.

As intervenções realizadas se limitarão a modificações na dieta como forma de adequar os aminoácidos sanguíneos. Os dados referentes ao paciente são sigilosos e privados, garantindo seu anonimato, sendo que o Sr. (a) poderá solicitar informações durante toda a fase de pesquisa.

O Sr. (a) foi esclarecido (a) de que ao autorizar a participação de seu (sua) filho (a) nessa pesquisa, ele (a) estará fazendo parte de um estudo acadêmico, com o objetivo de avaliar as melhorias decorrentes das modificações no atendimento clínico e nutricional. Embora o Sr. (a) venha aceitar participar desta pesquisa, poderá desistir a qualquer momento, bastando para isso informar sua desistência da maneira que lhe for mais conveniente, não havendo prejuízo algum para você, ou algum membro de sua família. Se o Sr. (a) optar por não autorizar a participação na pesquisa não haverá qualquer tipo de prejuízo a vocês ou ao tratamento e acompanhamento clínico de seu filho.

Por ser de participação voluntária, e sem interesses financeiros, o Sr (a) não terá direito a nenhuma forma de remuneração. Os desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa se referem àqueles inerentes à coleta de sangue e serão minimizados pela utilização de materiais adequados e equipe capacitada para o procedimento.

Tenho ciência do exposto e concordo em participar deste estudo. Autorizo a utilização e publicação dos dados clínicos e laboratoriais analisados e obtidos nesta pesquisa em revistas científicas, periódicos, livros, pôsteres, apresentações de slides e na dissertação de mestrado na qual este projeto está vinculado, sem a identificação do meu nome.

Você receberá uma cópia desse documento, assinada e com todas as informações de contato do pesquisador, devendo procurá-lo no caso de alguma dúvida.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 2013

Pai/responsável:

Nome completo: _____

Assinatura: _____

Crianças maiores de 7 anos:

Nome: _____

Assinatura: _____

Apêndice 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (HC-UFG)

Pesquisa: Avaliação genética, clínica, nutricional e do neurodesenvolvimento de pacientes com Leucínose

Pesquisador: Ana Facury da Cruz

Coordenador: Eugênia Ribeiro Valadares

Comitê de Ética em Pesquisa da UFG: Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – SL 2005 – CEP: 31.270-901 – BH/MG – Tel: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4516 – e-mail: prpq@coep.ufmg.br

Prezado(a) Senhor(a),

Seu filho está sendo convidado a participar de uma pesquisa de Mestrado intitulada “**Avaliação genética, clínica, nutricional e do neurodesenvolvimento de pacientes com Leucínose**”, realizada pela Faculdade de Medicina da UFG.

A Leucínose é uma doença rara que afeta crianças ao nascimento e exige que essas sigam uma dieta especial restrita em proteínas por toda a vida. Sabe-se que o monitoramento e controle dos aminoácidos no sangue estão relacionados ao melhor desenvolvimento de crianças com Leucínose. Este estudo visa, portanto, trazer melhorias ao atendimento dos pacientes através da realização rotineira dessas dosagens e correção dietética das alterações encontradas. Para isso é necessário obter valores de aminoácidos sanguíneos de crianças saudáveis para que possamos compará-los aos valores das crianças com a doença.

Serão coletadas amostras de sangue em papel filtro e em tubo de EDTA para análise de aminoácidos no sangue. As amostras serão descartadas após o período de um ano, sendo utilizadas apenas para essa pesquisa, sendo dosadas por duas técnicas diferentes no Laboratório Hermes Pardini e posteriormente no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo.

Os dados referentes à criança são sigilosos e privados, garantindo seu anonimato, sendo que o Sr (a) poderá solicitar informações durante toda a fase de pesquisa.

O Sr (a) foi esclarecido (a) de que ao autorizar a participação de seu (sua) filho (a) nessa pesquisa, ele (a) estará fazendo parte de um estudo acadêmico, com o objetivo de avaliar as melhorias decorrentes das modificações no atendimento clínico e nutricional. Embora o Sr. (a) venha aceitar participar desta pesquisa, poderá desistir a qualquer momento, bastando para isso informar sua desistência da maneira que lhe for mais conveniente, não havendo prejuízo algum para você, ou algum membro de sua família. Se o Sr. (a) optar por não autorizar a participação na pesquisa não haverá qualquer tipo de prejuízo a vocês ou ao tratamento e acompanhamento clínico de seu filho.

Por ser de participação voluntária, e sem interesses financeiros, o Sr (a) não terá direito a nenhuma forma de remuneração. Os desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa se referem àqueles inerentes à coleta de sangue e serão minimizados pela utilização de materiais adequados e equipe capacitada para o procedimento.

Tenho ciência do exposto e concordo em participar deste estudo. Autorizo a utilização e publicação dos dados clínicos e laboratoriais analisados e obtidos nesta pesquisa em revistas científicas, periódicos, livros, pôsteres, apresentações de slides e na dissertação de mestrado na qual este projeto está vinculado, sem a identificação do meu nome.

Você receberá uma cópia desse documento, assinada e com todas as informações de contato do pesquisador, devendo procurá-lo no caso de alguma dúvida.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 2013

Pai/responsável:

Nome completo: _____

Assinatura: _____

Crianças maiores de 7 anos:

Nome: _____

Assinatura: _____