



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANÁLISE QUANTITATIVA DE AMINOÁCIDOS POR HPLC EM
SANGUE E URINA COLETADOS EM PAPEL-FILTRO NO PERÍODO
NEONATAL: VALIDAÇÃO DE MÉTODO, ESTABELECIMENTO DE
VALORES DE REFERÊNCIA E APLICAÇÃO PRÁTICA EM ERROS
INATOS DO METABOLISMO

LINHA DE PESQUISA:

Distúrbios do Período Perinatal e Neonatal: Aspectos Clínicos e Genéticos

ALUNA: Daniela Magalhães Nolasco

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

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a Isabel Cristina Pereira Fortes

Belo Horizonte

2017

DANIELA MAGALHÃES NOLASCO

ANÁLISE QUANTITATIVA DE AMINOÁCIDOS POR HPLC EM SANGUE E URINA
COLETADOS EM PAPEL-FILTRO NO PERÍODO NEONATAL: VALIDAÇÃO DE
MÉTODO, ESTABELECIMENTO DE VALORES DE REFERÊNCIA E APLICAÇÃO
PRÁTICA EM ERROS INATOS DO METABOLISMO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Eugênia Ribeiro Valadares
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a Isabel Cristina Pereira Fortes

Belo Horizonte
2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma oportunidade de crescimento e aprendizado e por Sua presença constante em todos os momentos da minha vida.

À minha família, especialmente meus pais e irmão, Lourdes, Edson e Guilherme, que sempre me apoiaram e incentivaram a lutar pelos meus sonhos e nunca desistir diante das dificuldades. Obrigada pela presença constante, força, compreensão e por serem meu porto seguro.

Ao meu marido, Guilherme Neves, que me auxiliou de todas as formas possíveis para que esse trabalho fosse concluído com êxito. Agradeço pelo incentivo permanente e pela força constante, sempre me impulsionando a realizar os meus objetivos. Obrigada pelo amor, companheirismo, amparo nos momentos mais difíceis, conselhos e pela enorme compreensão.

Às minhas orientadoras, professoras Eugênia Valadares e Isabel Fortes, por me acolherem tão gentilmente e confiarem em meu trabalho. Agradeço todo o aprendizado, incentivo e paciência durante esses anos de trabalho em conjunto. Meu carinho e minha admiração por vocês são enormes.

Aos meus colegas de trabalho e aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado, agradeço pelos momentos de descontração, companheirismo, compreensão pelas ausências, apoio e, sobretudo, pela amizade de vocês. Com certeza, tornaram essa caminhada mais leve.

Ao Dr. José Nélio Januário e Roberto Vagner, pela compreensão e apoio, o que permitiu que eu desenvolvesse esse trabalho com dedicação e concluísse uma fase tão importante em minha vida acadêmica.

Aos colaboradores que já passaram pelo Laboratório de EIM (HC-UFMG), em especial, Érika Neves, agradeço o auxílio, incentivo e apoio na realização deste trabalho.

Aos funcionários do alojamento materno do Hospital das Clínicas da UFMG, por me receberem de portas abertas e permitirem que eu realizasse meu trabalho de forma tranquila e com total liberdade; aos pais dos recém-nascidos que aceitaram participar deste trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições.

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

RESUMO

INTRODUÇÃO: Erros inatos do metabolismo constituem um grupo diversificado de doenças individualmente raras, mas que agrupados correspondem a 10% das doenças genéticas já descritas. Ocorrem por um defeito enzimático específico que leva à interrupção de uma via metabólica. Dentre eles se encontram as aminoacidopatias. As análises quantitativas de aminoácidos no sangue e na urina são exames especialmente indicados para diagnóstico e acompanhamento de pacientes com aminoacidopatias e a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a mais utilizada para essa detecção. A coleta de amostras em papel filtro vem crescendo exponencialmente e são muitas as vantagens atribuídas a amostras biológicas processadas desta forma. **OBJETIVOS:** Validar um método de análise quantitativa de aminoácidos por HPLC em sangue e urina coletados em papel-filtro e estabelecer valores de referência no período neonatal. **METODOLOGIA:** Amostras de sangue coletado por punção venosa aplicado em papel-filtro (n=58) e urina coletada em papel-filtro colocado na fralda (n=45), de um grupo de recém-nascidos saudáveis, com idades entre dois e nove dias. Pré-tratamento e extração das amostras segundo metodologia descrita por Yamaguchi (1997). Separação dos aminoácidos por HPLC, modelo Alliance HT Waters e2795, coluna de fase reversa C18. **RESULTADOS:** A separação cromatográfica dos aminoácidos foi adequada. O método demonstrou linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade e recuperação satisfatórios. Foi detectado efeito de matriz para todos os aminoácidos. Os valores de referência para os aminoácidos aspartato, serina, glutamato, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, cistina, tirosina, valina, metionina, lisina, isoleucina, leucina e fenilalanina foram definidos. **CONCLUSÕES:** Este trabalho descreveu um método simples, rápido e eficaz para análise simultânea de 17 aminoácidos em sangue e urina coletados em papel filtro em uma única corrida e os valores de referência foram estabelecidos e validados. Esse método pode ser utilizado em laboratórios de rotina e é uma ferramenta ideal para a área pediátrica, onde obter um grande volume de amostra nem sempre é possível.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Inborn errors of metabolism constitute a diverse group of individually rare diseases, but collectively correspond to 10% of the genetic diseases already described. They occur by a specific enzymatic defect that leads to the interruption of a metabolic pathway. Among them, we have the aminoacidopathies. Quantitative analysis of amino acids in blood and urine are especially indicated for the diagnosis and follow-up of patients with amino acid disorders and the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique is the most used for this detection. Sample collection on filter paper has been increasing exponentially and there are many advantages attributed to biological samples processed in this way.

OBJECTIVES: To validate a method of quantitative analysis of amino acids by HPLC in blood and urine collected on filter paper and to establish reference values in the neonatal period.

METHODS: Samples of blood collected by venipuncture and applied on filter paper (n = 58) and urine collected on filter paper (n = 45) from a group of healthy newborns aged 2 to 9 days. Pre-treatment and extraction of samples according to Yamaguchi (1997). Separation of amino acids by HPLC, Alliance HT Waters model e2795, C18 reverse phase column.

RESULTS: Chromatographic separation of amino acids was adequate. The method demonstrated satisfactory linearity, limits of detection and quantification, repeatability and recovery. Matrix effect was detected for all amino acids. The reference values for the amino acids aspartate, serine, glutamate, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, proline, cystine, tyrosine, valine, methionine, lysine, isoleucine, leucine and phenylalanine were defined.

CONCLUSIONS: This work described a simple, fast and effective method for simultaneous analysis of 17 amino acids in blood and urine collected on filter paper in a single run and the reference values were established and validated. This method can be used in routine laboratories and it is an ideal tool for the pediatric area, where obtaining a large sample volume is not always possible.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conseqüências dos Erros inatos do metabolismo	14
Figura 2 - Estrutura química geral dos aminoácidos	21
Figura 3 - Conversão da fenilalanina em tirosina	23
Figura 4 - Vias metabólicas no catabolismo da leucina, isoleucina e valina	25
Figura 5 - Estrutura química da tirosina	27
Figura 6 - Estrutura química da metionina	30
Figura 7 - Estrutura química da glicina.....	31
Figura 8 - Estrutura química da cistina.....	32
Figura 9 - Estrutura química da histidina.....	34
Figura 10 - Estrutura química da prolina	35
Figura 11 - Estrutura química da Lisina.....	36
Figura 12 - Estrutura química da serina	36
Figura 13 - Estrutura química da Arginina.....	39
Figura 14 - Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos desse estudo.	56
Figura 15 - Coleta de sangue e urina em papel-filtro.	61
Figura 16 – Picotagem da amostra em placa. Picotador com diâmetro de 3,0 mm. .	62
Figura 17 – Extração da urina com adição de água ultrapura e repouso por 48 horas.	63
Figura 18 – Cromatógrafo líquido modelo Alliance HT Waters.....	64
Figura 19 – Perfil cromatográfico de padrão de aminoácidos com concentração de 1000 nmol/mL.....	69
Figura 20 - Linearidade para Fenilalanina (PHE) em papel filtro. Amostras realizadas em triplicata.	71
Figura 21 - Linearidade para Leucina em solução salina 0,9% (m/v). Amostras realizadas em triplicata.....	71
Figura 22 - Linearidade para Alanina em papel filtro. Amostras realizadas em triplicata.	72
Figura 23 - Linearidade para Tirosina em solução salina. Amostras realizadas em triplicata.	72
Figura 24 - Curva analítica pelo método de adição de padrão. Estudo do efeito de matriz para a tirosina. Testes realizados em triplicata.....	76

Figura 25 – Comparação das curvas analíticas pelos métodos de rotina e de adição de padrão. Estudo do efeito de matriz para a leucina.	77
Figura 26 - Distribuição de recém-nascidos de acordo com gênero e idade. A altura das barras representa a frequência, ou seja, o número de crianças para cada gênero.	80
Figura 27 - Distribuição de recém-nascidos de acordo com gênero e idade. A altura das barras representa a frequência, ou seja, o número de crianças para cada gênero.	82
Figura 28 - Comparação das concentrações dos aminoácidos em amostra de sangue e urina do mesmo paciente colhidas no mesmo dia e em papel filtro.....	86
Figura 29 - Cromatograma relativo aos aminoácidos presentes em paciente com doença da urina de xarope do bordo, realizado com amostra de sangue coletada em papel filtro, onde há um aumento das concentrações de valina, isoleucina e leucina.	87
Figura 30 – Cromatograma relativo aos aminoácidos presentes em paciente com doença da urina de xarope do bordo, realizado com amostra de urina coletada em papel filtro, onde há um aumento das concentrações de valina e leucina.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos aminoácidos.....	20
Tabela 2 - Protocolo de investigação laboratorial para EIM, segundo Weiner, 2010.	41
Tabela 3 - Interpretação das principais variações de aminoácidos séricos em humanos.	50
Tabela 4 - Programa de gradiente de concentração da fase móvel utilizada no HPLC ..	65
Tabela 5 - Adição de padrão em amostras para verificação do efeito de matriz.....	67
Tabela 6 - Repetibilidade do método para amostras em papel-filtro e em solução salina 0,9 % (m/v).	74
Tabela 7 – Concentrações (nmol/mL) das amostras no estudo do efeito de matriz.....	76
Tabela 8 - Recuperação das amostras de aminoácidos em papel filtro.....	78
Tabela 9 - Valor-p obtido pela comparação entre as médias das concentrações dos aminoácidos encontradas no sangue em relação ao peso e prematuridade.	81
Tabela 10 - Valor-p obtido pela comparação entre as concentrações dos aminoácidos encontradas na urina em relação ao peso e prematuridade.	83
Tabela 11 - Valores de referência dos aminoácidos para amostras de sangue e urina de recém-nascidos coletados em papel filtro.....	85
Tabela 12 - Estudo da linearidade em papel filtro para todos os aminoácidos.	101
Tabela 13 - Estudo da linearidade em solução salina 0,9% (m/v) para todos os aminoácidos	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AABA	ácido α -aminobutírico
AACR	aminoácidos de cadeia ramificada
ALA	Alanina
AQC	6-aminoquinolyl-N-hidroxisuccinimidil carbamato
ARG	Arginina
ASP	Ácido Aspártico
BH4	Cofator tetraidrobiopterina
CG	Cromatografia gasosa
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CV	Coefficiente de Variação
CYS	Cistina
DBS	Sangue seco em papel filtro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
FDA	Food and Drug Administration
FN	Falso-negativos
FP	Falso-positivos
GABA	Ácido gama aminobutírico
GLU	Ácido Glutâmico
GLY	Glicina
HC	Hospital das Clínicas
HIS	Histidina
HPLC	Do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPI	Hiperprolinemia tipo I
HP II	Hiperprolinemia tipo II
ILE	Isoleucina
Kg	Quilo
LD	Limite de detecção
LEIM	Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo
LEU	Leucina
LQ	Limite de quantificação
LYS	Lisina

m/v	Massa/volume
MET	Metionina
mL	Mililitro
MS/MS	Espectrometria de massas
nmol	Nanomol
OPA	Orto-phthalaldeido
OTC	Ornitina transcarbamilase
PAH	Fenilalanina hidroxilase
PF	Papel filtro
PHE	Fenilalanina
PKU	Fenilcetonúria
PRO	Prolina
SER	Serina
Sol.	Solução
SUS	Sistema Único de Saúde
THR	Treonina
TYR	Tirosina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Histórico	15
1.2 Classificação dos EIM.....	16
1.3 Manifestações Clínicas dos erros inatos do metabolismo no período neonatal.....	19
1.4 Aminoácidos.....	20
1.5 EIM que apresentam alterações de aminoácidos	22
1.5.1 Aminoacidopatias	22
1.5.2 Acidemias / Acidúrias orgânicas.....	37
1.5.3 Distúrbios do ciclo da ureia.....	38
1.6 Investigação laboratorial dos erros inatos do metabolismo no período neonatal.....	39
1.6.1 Evolução das técnicas laboratoriais de dosagem de aminoácidos	42
1.6.2 Aplicação do papel filtro para coleta de amostras biológicas	47
1.6.3 Interferências em análises.....	48
1.6.4 Idade.....	48
1.6.5 Nutrição	49
1.6.6 Medicamentos	49
1.7 Diagnóstico	49
1.8 Tratamento.....	51
1.9 Determinação de valores de referência de analitos	52
1.9.1 Intervalos de Referência e Limites de Decisão Clínica.....	53
1.9.2 Sensibilidade e Especificidade	54
1.9.3 Alta sensibilidade e alta especificidade	54
1.9.4 Tratamento estatístico	55

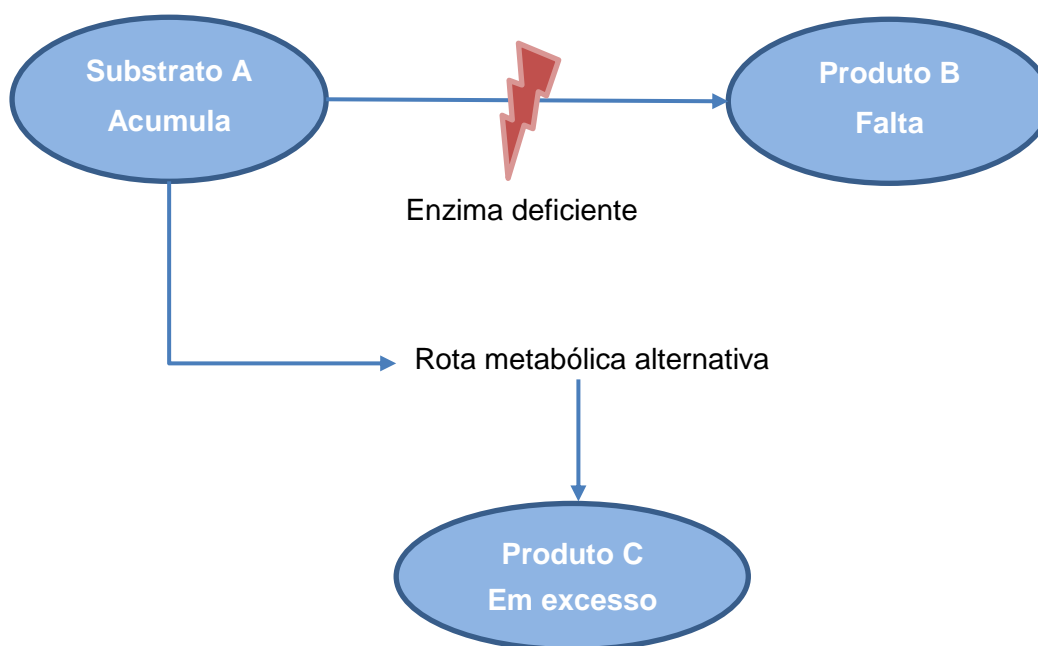
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	56
2.1 Estratégia para busca e seleção de informações.....	56
3 JUSTIFICATIVA.....	57
4 OBJETIVOS	59
4.1 Objetivo geral	59
4.2 Objetivos específicos	59
5 MATERIAL E MÉTODOS	60
5.1 Aspectos éticos	60
5.2 Desenho do estudo	60
5.3 Reagentes e solventes.....	60
5.4 Coleta e pré-tratamento da amostra	61
5.4.1 Sangue em papel-filtro.....	62
5.4.2 Urina em papel filtro	63
5.5 Validação da metodologia.....	64
5.5.1 Linearidade.....	65
5.5.2 Repetibilidade.....	66
5.5.3 Limites de Detecção e de Quantificação	66
5.5.4 Efeito de matriz.....	66
5.5.5 Recuperação	67
5.5.6 Análise estatística.....	67
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
6.1 Validação do método	68
6.1.1 Linearidade.....	70
6.1.2 Repetibilidade.....	73
6.1.3 Limites de Detecção e de Quantificação	75
6.1.4 Efeito matriz.....	75
6.1.5 Recuperação	77

6.1.6 Análise estatística.....	79
6.2 Quantificação dos aminoácidos em sangue e urina coletados em papel filtro em recém-nascidos.....	79
6.2.1 Sangue em papel filtro.....	80
6.2.2 Urina em papel filtro	82
6.2.3 Valores de referência.....	84
7 CONCLUSÕES.....	91
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS.....	101
Anexo I.....	101
Anexo II.....	104
Anexo III.....	107
Anexo IV	108
APÊNDICE	109
Apêndice I.....	109

1 INTRODUÇÃO

Erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças metabólicas genéticas que geralmente, correspondem a um defeito enzimático que leva a interrupção de uma via metabólica. Eles causam alguma falha na síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo (SCRIVER, 2001, WEINER, 2010). Como consequência, os EIM podem levar à ausência de um metabólito, ao acúmulo de substrato da etapa anterior àquela que foi interrompida ou ao surgimento de uma rota metabólica alternativa, como mostra a Figura 1, ocasionando o comprometimento dos processos celulares (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Figura 1 - Consequências dos Erros inatos do metabolismo



Embora os EIM constituam um grupo diversificado de doenças individualmente raras, agrupados correspondem a 10% das doenças genéticas descritas (JIMENEZ-SANCHEZ, CHILDS E VALLE, 2001). A incidência isolada de cada uma destas doenças metabólicas genéticas é pequena, uma vez que se trata de doenças com padrão de herança autossômica recessiva em sua grande maioria. No entanto, já foram descritos mais de 1000 distúrbios conhecidos para os EIM e, assim, a frequência se torna mais expressiva (WEINER, 2010; MAK, et al., 2013).

Sua relativa raridade e apresentação inespecífica podem contribuir para o atraso ou não realização do diagnóstico, com consequências às vezes irreparáveis para o desenvolvimento do paciente (JARDIM E ASTHON-PROLLA, 1996).

A maioria se manifesta na faixa etária pediátrica e representa causa relevante de morbidade e mortalidade (CARRAGHER, CHAMPION, 2014; SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016), sendo que cerca de 30% dos erros inatos do metabolismo cursam com anormalidades neurológicas (SOUZA, et al., 2007).

1.1 Histórico

O termo EIM foi proposto por *Sir Archibald Garrod*, no princípio do século XX. Garrod observou, através de seus estudos sobre alcaptonúria, albinismo e cistinúria, que os indivíduos afetados apresentavam concentração anormal de metabólitos, sugerindo a presença de defeitos pontuais no metabolismo dessas moléculas (KARAM, 2001; SCRIVER, 2001).

À Garrod se deve o termo consagrado “Erros Inatos do Metabolismo”, título de seu livro, publicado em 1909, onde descreveu além da alcaptonúria, outras doenças metabólicas como o albinismo, porfiria e pentosúria (EL HUSNY e FERNANDES-CALDATO, 2006; SCRIVER, 2001). 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).

Ao longo dos anos, outros distúrbios foram sendo descritos e essas descobertas abriram novas perspectivas na medicina preventiva. Bebês com distúrbios metabólicos de aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos graxos passam a ser detectados em laboratório e essa detecção precoce oferece três possibilidades (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016):

- ✓ A doença pode se apresentar nos primeiros dias de vida, antes de qualquer resultado de laboratório estar disponível. Os distúrbios incluem apresentações neonatais de defeitos do ciclo da ureia, acidemias orgânicas, tais como acidemia metilmalônica e, menos comumente, quase que qualquer um dos defeitos de oxidação dos ácidos graxos.

- ✓ O distúrbio pode ter apresentação posterior e um tratamento eficaz pode benéficamente alterar a história natural do bebê. A maioria das condições incluídas nos programas de triagem de recém-nascidos se enquadra nesta categoria.
- ✓ A desordem pode ser benigna e os casos não terão nenhum benefício do diagnóstico precoce.

1.2 Classificação dos EIM

Da perspectiva fisiopatológica, os distúrbios metabólicos podem ser divididos em três grupos, de acordo com os fenótipos clínicos da doença:

Grupo 1: Distúrbios que dão origem à intoxicação

Este grupo inclui os erros inatos do metabolismo intermediário que levam a uma intoxicação aguda ou progressiva da acumulação de compostos tóxicos próximo ao bloqueio metabólico. Alguns exemplos de doenças que fazem parte desse grupo, de acordo com Saudubray (2016) e Weiner (2010):

- ✓ Aminoacidopatias (fenilcetonúria, doença de xarope de bordo, homocistinúria, tirosinemia, etc.),
- ✓ Acidúrias orgânicas (acidemias metilmalônica propiônica, isovalérica, glutárica),
- ✓ Defeitos do ciclo da ureia (acidúria arginosuccinica, citrulinemia).
- ✓ Intolerâncias ao açúcar, como galactosemia e intolerância hereditária à frutose.

Todas as condições atribuíveis ao grupo possuem semelhanças clínicas: eles não interferem no desenvolvimento do embrião e se apresentam com um intervalo livre de sintomas e sinais clínicos de "intoxicação", que pode ser aguda (vômito, coma, insuficiência hepática, complicações tromboembólicas, etc.) ou crônica, como déficit de crescimento, atraso no desenvolvimento, cardiomiopatia, entre outros (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

O diagnóstico é simples e mais comumente se baseia na análise de aminoácidos no plasma e urina, ácidos orgânicos e acilcarnitinas utilizando técnicas cromatográficas. A maioria destas desordens é tratável e requer a remoção da toxina por dietas especiais, procedimentos extra-corporais ou medicamentos, como carnitina, benzoato de sódio, penicilamina, entre outros (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016). O tratamento é frequentemente nutricional, por meio da restrição da substância nociva da dieta (MARTINS, 2003).

Embora a fisiopatologia seja um pouco diferente, os erros inatos da síntese e do catabolismo de neurotransmissores (monoaminas, GABA e glicina) e os da síntese de aminoácidos (serina, glutamina e prolina / ornitina) também podem ser incluídos neste grupo, uma vez que eles possuem muitas características em comum: são erros inatos do metabolismo intermediário, o diagnóstico baseia-se em investigações de plasma e de urina (aminoácido, ácido orgânico, etc.) e alguns são passíveis de tratamento (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Grupo 2: Distúrbios envolvendo metabolismo energético

Estes consistem nos erros inatos com sintomas causados, pelo menos em parte, pela deficiência na produção ou na utilização de energia, devido a distúrbios no fígado, miocárdio, músculo, cérebro ou outros tecidos. Este grupo pode ser dividido em defeitos de energia mitocondrial e citoplasmática (WEINER, 2010; EL-HATTAB, 2015).

Defeitos mitocondriais normalmente são os mais graves e geralmente intratáveis. Eles englobam (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016):

- ✓ Acidemias lácticas congênitas (defeitos do transportador de piruvato, piruvato carboxilase e piruvato desidrogenase, além das enzimas do ciclo de Krebs);
- ✓ Doenças das cadeias respiratórias mitocondriais (que perturbam a própria cadeia respiratória, transportadores mitocondriais, ou a síntese da coenzima Q10);
- ✓ Defeitos de oxidação dos ácidos graxos e metabolismo de corpos cetônicos.

Defeitos de energia citoplasmática são geralmente menos graves. Eles incluem:

- ✓ Distúrbios de glicólise;
- ✓ Metabolismo do glicogênio e gluconeogênese;
- ✓ Hiperinsulinemia (todas as doenças tratáveis).

Os sintomas mais comuns são hipoglicemia, hepatomegalia, hipotonia grave generalizada, cardiomiopatia e morte súbita (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016). Esses distúrbios apresentam sintomas permanentes que tendem a acentuar com o passar do tempo (EL HUSNY e FERNANDES-CALDATO, 2006).

O tratamento nutricional deste grupo vai ser preconizado de acordo com o tipo de doença, como alimentação frequente, com restrição de lactose e frutose, e prescrição de amido de milho cru para prevenção da hipoglicemia na glicogenose tipo 1, ou dieta cetogênica ou rica em carboidratos nas hiperlactemias. A suplementação de cofatores (L-carnitina, tiamina) pode também ser utilizada em doenças específicas (MARTINS, 2003).

Grupo 3: Distúrbios envolvendo moléculas complexas

Este grupo é constituído por distúrbios da síntese ou catabolismo de macromoléculas, como hormônios, proteínas plasmáticas e enzimas. Nestes casos, a síntese pode ser incompleta ou anormal (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016). Os sintomas são permanentes, progressivos, independentes de intercorrências e sem relação com a ingestão de alimentos. Pertencem a este grupo (WEINER, 2010; EL-HATTAB, 2015):

- ✓ Doenças lisossomais;
- ✓ Distúrbios peroxissomais;
- ✓ Distúrbios congênitos da glicosilação (CDGs);
- ✓ Erros inatos da síntese do colesterol.

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 para algumas doenças lisossomais (MARTINS, 2003).

1.3 Manifestações Clínicas dos erros inatos do metabolismo no período neonatal

No período neonatal, há um predomínio dos grupos 1 e 2. O recém-nascido tem um repertório limitado de respostas às doenças graves. EIM podem apresentar manifestações inespecíficas, tais como dificuldade respiratória, hipotonia, fraco reflexo de sucção, vômitos, diarreia, desidratação, letargia e convulsões, problemas que podem ser facilmente atribuídos a sepse ou alguma outra causa comum (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

De maneira geral, as manifestações clínicas não estão presentes ao nascimento, mas podem ocorrer desde as primeiras horas de vida até semanas, meses ou mesmo anos de vida do indivíduo (EL HUSNY e FERNANDES-CALDATO, 2006; SCRIVER, 2001).

Nas doenças do grupo 1 (EIM que dão origem a intoxicação), um quadro clínico extremamente sugestivo é a de um bebê recém-nascido a termo depois de uma gravidez normal, que, após um período inicial totalmente livre de sintomas, deteriora-se por nenhuma aparente razão e não responde à terapia sintomática. O intervalo entre o nascimento e sintomas clínicos pode variar de horas a semanas, dependendo da natureza do bloqueio metabólico e do ambiente (HOFFMANN, ZSCHOCKE e NYHAN, 2016). A deterioração inesperada depois de um período inicial normal é a indicação mais importante para este grupo de EIM (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Nos distúrbios do grupo 2 (deficiências de energia), a apresentação clínica é muitas vezes menos sugestiva e exibe gravidade variável. A maioria dos erros inatos que resultam em intoxicação ou deficiência de energia é levada à atenção médica por causa da deterioração neurológica (coma, letargia) (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Em um estágio mais avançado, problemas neurovegetativos com anormalidades respiratórias, soluços, apneias, bradicardia e hipotermia podem se desenvolver. No estado de coma, alterações características no tônus muscular e

movimentos involuntários aparecem. (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

1.4 Aminoácidos

Os aminoácidos constituem os blocos de construção das nossas proteínas e peptídeos e, como tal, são as substâncias mais importantes no organismo humano, pois possuem funções diversas no metabolismo e na neurotransmissão do mesmo (BURTIS, BRUNS, 2015).

Uma proteína é composta por cerca de 20 aminoácidos diferentes e sua função no organismo depende da sequência de aminoácidos a qual é formada (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008; COX, 2013).

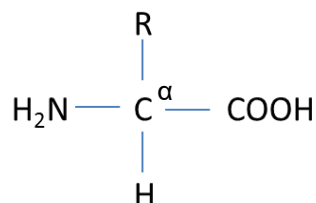
Destes 20 aminoácidos, 11 são sintetizados endogenamente e são conhecidos como aminoácidos não-essenciais. Os outros nove são derivados apenas da dieta, chamados aminoácidos essenciais (SALWAY, 2009), conforme demonstra a tabela abaixo.

Tabela 1 - Classificação dos aminoácidos

Aminoácidos não essenciais	Aminoácidos essenciais
Aspartato	Fenilalanina
Tirosina	Treonina
Asparagina	Metionina
Alanina	Lisina
Serina	Triptofano
Glicina	Leucina
Cisteína	Isoleucina
Glutamato	Valina
Glutamina	Histidina
Prolina	
Arginina	

O nome aminoácido deriva da sua estrutura química (Figura 2), que é formada por um carbono central ligado a um grupamento amino (NH_2), um grupamento carboxila (COOH) e um átomo de hidrogênio, variando apenas a cadeia carbonada lateral, chamada de grupamento R (ALCANTARA, 2012).

Figura 2 - Estrutura química geral dos aminoácidos



Eles diferem uns dos outros por essas cadeias laterais, que variam em estrutura, tamanho e carga elétrica. Para todos os aminoácidos comuns, o carbono está ligado a quatro grupos diferentes: um grupo carboxilo, um grupo amino, um grupo R, e um grupo hidrogênio, com exceção da glicina, onde o grupo R é outro átomo de hidrogênio (COX, 2013).

Devido ao arranjo tetraédrico dos orbitais de ligação ao redor do carbono alfa dos aminoácidos, os quatro grupos substituintes podem ocupar duas disposições espaciais distintas, que são imagens especulares, não superponíveis, chamadas de enantiômeros, uma classe dos estereoisômeros. Os símbolos D- e L- referem-se à configuração absoluta dos substituintes ao redor do átomo de carbono quiral. Quase todos os compostos biológicos com centro quiral ocorrem naturalmente em apenas uma forma estereoisomérica, D ou L. Os aminoácidos nas moléculas proteicas são sempre L-estereoisômeros, ou seja, as proteínas contêm apenas L-aminoácidos (Wendisch, 2007).

Todas as moléculas com centros quirais são também opticamente ativas. Elas podem girar o plano da luz planopolarizada. Essa rotação é diferente para os diferentes estereoisômeros (Wendisch, 2007).

Os aminoácidos são intermediários importantes em muitas vias metabólicas, incluindo o ciclo da ureia, o ciclo da alanina na transferência de fontes de energia do músculo ao fígado, geração de amônia no fígado, entre outros. Também são precursores de muitas substâncias, tais como os hormônios da tireóide, catecolaminas e serotonina (BURTIS, BRUNS, 2015).

A dosagem de aminoácidos em pacientes auxilia nos estudos sobre o metabolismo e o diagnóstico de distúrbios patológicos e de hereditariedade (BURTIS, BRUNS, 2015).

1.5 EIM que apresentam alterações de aminoácidos

1.5.1 Aminoacidopatias

As aminoacidopatias constituem extenso capítulo dentre os erros inatos do metabolismo e, coletivamente, afetam aproximadamente 1 em 8000 recém-nascidos (BURTIS, BRUNS, 2015). Quase todas são doenças autossômicas recessivas e resultam tipicamente de anormalidades na quebra dos aminoácidos no citosol (HOFFMANN, ZSCHOCKE, NYHAN, 2016). São causadas por mutações de genes que codificam proteínas específicas. Essas mutações podem resultar em uma alteração da estrutura primária da proteína ou da quantidade da proteína sintetizada. A capacidade funcional da proteína, seja ela uma enzima ou um veículo de transporte, pode ser comprometida relativa ou gravemente (BEHRMAN, 2002).

Os defeitos hereditários do catabolismo de aminoácidos, biossíntese, ou de transporte têm sido estudados durante muitos anos. A cistinúria estava entre as quatro primeiras doenças metabólicas hereditárias descritas por Garrod há 100 anos. A doença com maior impacto na comunidade, a fenilcetonúria (PKU), foi descoberta em 1930 (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008).

Os aminoácidos são componentes preciosos no organismo humano e, portanto, perdas urinárias são pequenas devido a um sistema de reabsorção tubular renal eficiente. Por causa disso, e porque a abordagem analítica é destinada a detectar desordens catabólicas e anabólicas, existe uma necessidade de identificar corretamente os níveis de aminoácidos quando aumentados ou diminuídos (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008).

As análises quantitativas de aminoácidos no sangue e na urina são exames especialmente indicados diante da suspeita de aminoacidopatias e para controle de pacientes com aminoacidopatias e acidemias orgânicas que fazem uso de fórmulas

dietéticas com restrição de aminoácidos e para decisões terapêuticas nos períodos de crises de descompensação (SHIH, 2003).

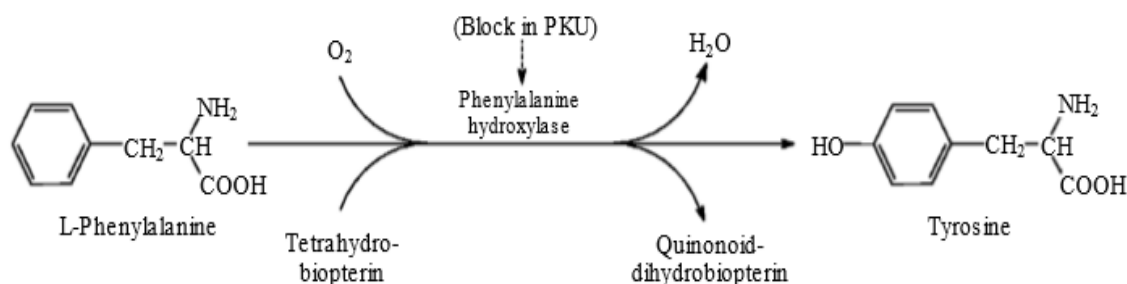
Alterações nos aminoácidos podem ser secundárias, tornando-se chaves para a suspeita de outras doenças metabólicas como galactosemia, acidemias orgânicas e doenças do metabolismo de piruvato. Elevações significativas de muitos aminoácidos, particularmente glutamina e alanina no sangue, têm sido relatadas em pacientes moribundos. Elevações de aminoácidos de cadeia ramificada, citrulina e arginina são provavelmente secundárias à hipóxia e insuficiência hepática (SHIH, 2003).

Os aminoácidos não são apenas associados com erros inatos do metabolismo; eles podem também servir como marcadores sensíveis do estado nutricional e da função de diversos órgãos tais como o fígado, os rins, intestino, e os músculos. As mudanças nas concentrações de aminoácidos ocasionadas pelo mau funcionamento destes órgãos podem ser sutis, portanto, a análise dos aminoácidos deve ter um nível razoavelmente elevado de exatidão a fim de interpretar essas mudanças (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008).

1.5.1.1. Hiperfenilalaninemias

A fenilalanina (Phe) é um aminoácido essencial, constituindo 4% a 6% de todas as proteínas da dieta. A fenilalanina que não é utilizada na síntese de proteínas é convertida em tirosina pela enzima fenilalanina hidroxilase.

Figura 3 - Conversão da fenilalanina em tirosina



Fonte: BURTIS, C.A., BRUNS, D.E. Tietz Fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics. Elsevier, Saunders, 7 ed. 2015.

As hiperfenilalaninemias são distúrbios do metabolismo de aminoácidos que levam ao desenvolvimento cognitivo e neurológico comprometidos, causando lesões cerebrais graves, a menos que o indivíduo seja tratado por uma rigorosa dieta de baixa ingestão de fenilalanina a partir do período neonatal (SUTTON, GRAHAM, 2015; BLAU, 2006).

A fenilcetonúria (PKU) clássica é causada por uma mutação no gene da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), que catalisa a hidroxilação da fenilalanina em tirosina (Tyr) e é expressa principalmente no fígado. Para que a reação da hidroxilação da Phe ocorra, é necessária a presença da PAH, oxigênio, fenilalanina e o cofator tetraidrobiopterina (BH4). Mutações na biossíntese ou na regeneração do BH4 também são detectadas nas hiperfenilalaninemias. Tanto a deficiência da enzima quanto a falta de seu cofator farão com que a fenilalanina aumente e que a tirosina diminua no sangue e nos tecidos (HOFFMANN, ZSCHOCKE, 2016).

A manifestação clínica mais importante e, algumas vezes, a única, é a deficiência mental grave. Os recém-nascidos são normais ao nascimento e essa deficiência pode não ser evidente nos primeiros meses de vida. Irritabilidade, erupção eczematoide e microcefalia também podem estar presentes (NYHAM, 2011).

O tratamento para PKU deve ser imediato, com uma dieta restrita de Phe e com suplementação dos outros aminoácidos através de fórmula proteica livre de Phe. Um tratamento adicional seria a administração de formas sintéticas do cofactor natural BH4. Os cofactores enzimáticos podem estabilizar uma enzima defeituosa para aumentar a função residual da enzima e melhorar o fluxo através da respectiva via metabólica (SUTTON, GRAHAM, 2015).

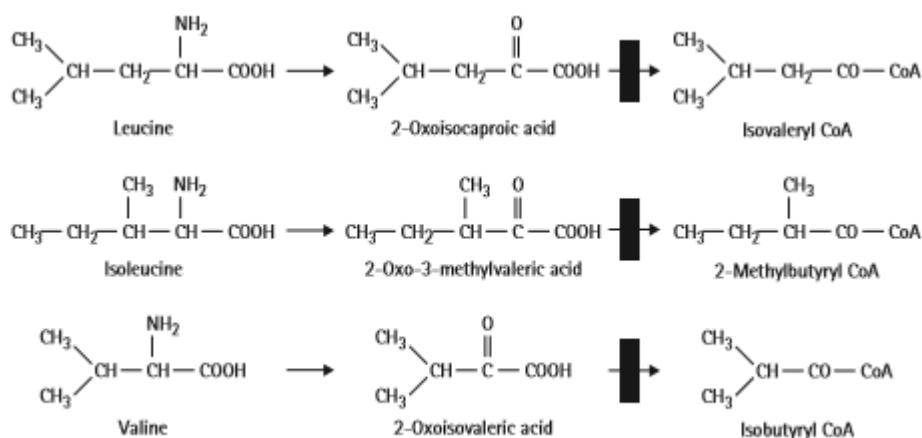
A triagem para fenilcetonúria tem sido realizada em países mais desenvolvidos desde os anos 1960. O teste inicial foi o "teste de Guthrie", um ensaio de inibição bacteriana e, embora este ensaio ainda seja usado em alguns laboratórios de triagem, a maior parte já o substituiu por métodos alternativos de análise utilizando diversas técnicas analíticas, tais como espectrofluorometria, cromatografia e, mais recentemente, espectrometria de massas (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

A análise quantitativa de aminoácidos em plasma demonstra níveis bastante elevados de fenilalanina na fenilcetonúria clássica e menos elevados nas outras formas de hiperfenilalaninemias; a razão Phe/Tyr também estará elevada nessas doenças (SUTTON, GRAHAM, 2015).

1.5.1.2. Doença da urina do xarope de bordo ou Leucínose

É um erro inato do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR): leucina, isoleucina e valina (SUTTON, GRAHAM, 2015). A causa é a deficiência do complexo enzimático α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, que catalisa a segunda etapa do processo metabólico dos AACR's, gerando um acúmulo destes e seus cetoácidos nos tecidos e plasma. Além do acúmulo ser tóxico ao sistema nervoso central, ele também produz um odor urinário característico, que dá nome à doença. (SHIH, 2003; EL-HATTAB, 2015).

Figura 4 - Vias metabólicas no catabolismo da leucina, isoleucina e valina



Fonte: NYHAN, W.L., BARSHOP, B.A., AI-AQEEL, A.I., 2011.

Embora grande parte do catabolismo dos aminoácidos ocorra no fígado, os três aminoácidos com cadeias laterais ramificadas (leucina, isoleucina e valina) são oxidados principalmente nos tecidos musculares, adiposo, renal e cerebral. Estes tecidos extra-hepáticos contêm a enzima aminotransferase, ausente no fígado, que atua sobre os três aminoácidos de cadeia ramificada para produzir os correspondentes cetoácidos (COX, 2013).

A Leucínose foi descrita pela primeira vez em 1954, por Menkes e colaboradores, que observaram um odor incomum bastante semelhante ao do xarope de bordo na urina de quatro crianças que morreram de uma doença encefalopática progressiva nas primeiras semanas de vida (NYHAN, 2011).

Crianças com a doença da urina de xarope de bordo clássica parecem normais ao nascimento, mas geralmente permanecem bem por apenas alguns dias. Vômitos ou dificuldade de alimentação podem ser os sintomas precoces. Normalmente, até o final da primeira semana, elas se tornam letárgicas e a deterioração neurológica progressiva é rápida; convulsões ocorrem regularmente e estes sintomas avançam para a apnéia, coma e morte, a menos que uma intervenção terapêutica vigorosa seja instituída (NYHAN, 2011).

A análise quantitativa de aminoácidos em plasma demonstram níveis significativamente elevados dos três aminoácidos de cadeia ramificada (SUTTON, GRAHAM, 2015).

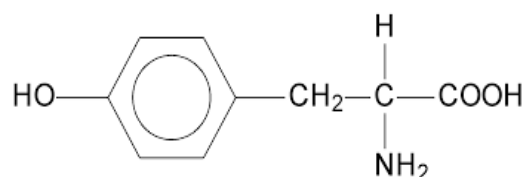
O tratamento implica controle rígido da dieta, sendo restrita em proteínas naturais e limitando a ingestão de valina, isoleucina e leucina ao mínimo necessário para permitir o crescimento normal (COX, 2013). Utiliza-se fórmula de aminoácidos para complementar as recomendações proteicas diárias (SNYDERMAN, 1964; MORTON, 2002).

A leucínose foi a segunda aminoacidopatia adicionada aos programas de triagem de recém-nascidos, após a fenilcetonúria, e foi inicialmente detectada pela técnica de cromatografia em camada delgada, seguida de ensaio de inibição bacteriana de leucina e valina (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

1.5.1.3. Tirosinemias

A tirosina é um aminoácido não essencial obtida por duas fontes, ingestão do aminoácido na dieta e pela hidroxilação da fenilalanina. Além de ser parte integrante de proteínas, é um precursor de dopa, tiroxina e melanina (SCRIVER, 2001; SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Figura 5 - Estrutura química da tirosina



A tirosinemia é uma aminoacidopatia causada por deficiência enzimática, expressa principalmente no fígado e, em pequena quantidade, nos rins (CHAKRAPANI, GISSEN, MCKIERNAN, 2012). Os distúrbios mais relevantes ocorrem pela deficiência da enzima fumarilacetoacetato-hidroxilase (tirosinemia tipo I), pela deficiência da enzima tirosina aminotransferase (tirosinemia tipo II) e por alteração dos níveis séricos de tirosina no período neonatal por imaturidade da enzima p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase hepática, além da ingestão hiperproteica e da deficiência de vitamina C (tirosinemia neonatal transitória). Os mamíferos conseguem tolerar períodos rápidos de hipertirosinemia, mas a forma crônica está associada a problemas neurológicos e de desenvolvimento (SCRIVER, 2001).

Tirosinemia tipo I – Hepatorrenal

A tirosinemia hepatorrenal, também conhecida como tirosinemia tipo I, tirosinose ou tirosinemia hereditária, geralmente segue dois padrões: a forma aguda, que se manifesta antes dos seis meses de idade com insuficiência hepática aguda, e a forma crônica, com doença hepática e renal, cardiomiopatia e morte após um ano de idade (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

O defeito molecular na tirosinemia hepatorrenal está na enzima hepática fumarilacetoacetato-hidroxilase. Essa enzima participa da via catabólica da tirosina, e, quando deficiente, causa a hipertirosinemia (NYHAN, 2011).

O efeito mais importante da doença ocorre no fígado. A crise hepática aguda é a apresentação precoce mais comum. O quadro patológico crônico se dá pela cirrose hepática e esplenomegalia (SCRIVER, 2001; SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016). Uma complicação frequente desta doença é o carcinoma hepatocelular (SUTTON, GRAHAM, 2015).

A triagem para essa doença já está incorporada em programas de triagem neonatal expandidos, utilizando a análise quantitativa de aminoácidos por HPLC ou espectrometria de massas (MS/MS) com a tirosina como o analito chave.

A desvantagem desses métodos é que os níveis de tirosina da tirosinemia transitória se sobrepõem ao da hepatorenal, indicando uma triagem positiva, sendo uma complicação para o correto diagnóstico desta doença. Além disso, alguns pacientes com tirosinemia tipo I têm níveis normais de tirosina. Por este motivo, o padrão-ouro no diagnóstico desta doença é a quantificação de succinilacetona na urina, pois o acetato de fumarato acumulado pela deficiência da enzima é convertido em succinilacetoacetato e a succinilacetona (NYHAN, 2011; SUTTON, GRAHAM, 2015).

As restrições da ingestão dietética de fenilalanina e tirosina diminuirão as concentrações de tirosina. Nos casos de insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular, o transplante se tornou o tratamento de escolha (NYHAN, 2011).

Tirosinemia tipo II – Oculocutânea

A tirosinemia oculocutânea é uma doença autossômica recessiva rara, caracterizada por queratose palmoplantar e erosões corneanas dolorosas. Foi descrita em 1967 por Campbell e colaboradores em um relato de um paciente com úlceras corneanas, lesões papulosas eritematosas nas palmas das mãos e pés e grave comprometimento do desenvolvimento mental (NYHAN, 2011; SUTTON, GRAHAM, 2015; SCRIVER, 2011).

Entre os distúrbios nos quais foram relatadas concentrações elevadas de tirosina, esta desordem parece ser uma verdadeira hipertirosinemia ou intoxicação por tirosina no sentido de que as manifestações clínicas são uma consequência dos níveis elevados de tirosina (NYHAN, 2011).

O sítio enzimático do defeito na tirosinemia oculocutânea está na tirosina aminotransferase hepática. Existem duas tirosina-aminotransferases, uma no citosol e outra nas mitocôndrias. Neste distúrbio, é a enzima citosólica que é deficiente; a atividade da enzima mitocondrial é normal (NYHAN, 2011).

As manifestações mais importantes da tirosinemia oculocutânea são aquelas envolvendo o olho, pois podem levar à cicatrização da córnea e comprometimento

visual permanente. A tirosina cristaliza nas células epiteliais da córnea, iniciando uma resposta inflamatória. Os sintomas oculares podem começar tão cedo quanto o primeiro dia de vida (SCRIVER, 2001; SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

A concentração de tirosina neste distúrbio é geralmente considerada maior do que em outras formas de tirosinemia. Além disso, a análise dos aminoácidos do sangue permite a sua distinção da tirosinemia transitória do recém-nascido porque as concentrações de outros aminoácidos, particularmente a fenilalanina e a metionina, não são elevadas. Nesta doença, a tirosina é o único aminoácido aumentado na urina, enquanto na tirosinemia tipo I ocorre uma aminoacidúria generalizada (NYHAN, 2011; SCRIVER, 2001).

O tratamento da tirosinemia oculocutânea consiste basicamente na instituição de uma dieta baixa em tirosina e fenilalanina. As lesões na pele e nos olhos normalmente melhoram após algumas semanas de utilização dessa terapia (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016; NYHAN, 2011).

Tirosinemia Neonatal Transitória

É o distúrbio mais comum do metabolismo dos aminoácidos, causada pelo desequilíbrio entre o catabolismo da tirosina e a atividade da enzima p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase hepática por imaturidade desta em recém-nascidos (SCRIVER, 2001).

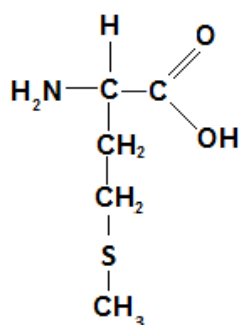
Fatores de risco para o desenvolvimento desta alteração transitória incluem prematuridade, alta ingestão de proteínas e deficiência de vitamina C (SCRIVER, 2001).

Geralmente o recém-nascido é assintomático e a tirosinemia é detectada apenas por exame bioquímico, a cromatografia de aminoácidos (SCRIVER, 2001).

1.5.1.4. Hipermetioninemia

Metionina é um aminoácido sulfurado, derivado do aspartato e essencial para a nutrição dos seres humanos. A hipermetioninemia pode ser causada por uma deficiência em qualquer dos três passos enzimáticos de conversão de metionina em homocisteína na via metabólica (SCRIVER, 2001; SUTTON, GRAHAM, 2015).

Figura 6 - Estrutura química da metionina



A maioria dos pacientes com deficiência hereditária da enzima é assintomático, tem desenvolvimento normal e não apresenta disfunção hepática, apesar de altas concentrações de metionina no sangue (SCRIVER, 2001; SUTTON, GRAHAM, 2015).

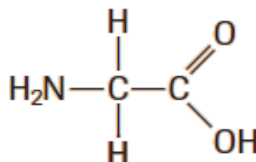
É diagnosticada pela análise quantitativa de aminoácidos no plasma, que demonstra níveis altos de metionina. Não há testes enzimáticos para essa desordem (SUTTON, GRAHAM, 2015).

1.5.1.5. Hiperglicinemia não-cetótica

Na hiperglicinemia não-cetótica, grandes quantidades de glicina, um aminoácido não essencial sintetizado principalmente a partir da serina, se acumulam nos fluidos corporais. Isso ocorre por um defeito no complexo enzimático responsável pela clivagem da glicina. Esse complexo, um sistema multienzimático mitocondrial, é composto de quatro subunidades proteicas diferentes e anomalias herdadas foram encontradas em três dessas subunidades (NYHAN, 2011; SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Foi chamada de "hiperglicinemia não cetótica" para distingui-la de outros distúrbios, como a acidemia propiônica, nos quais também ocorrem hiperglicinemia (NYHAN, 2011).

Figura 7 - Estrutura química da glicina



A maioria da hiperglicinemia não-cetótica se apresenta no período neonatal (85% como a forma neonatal grave e 15% como a forma neonatal atenuada). No fenótipo clássico desta doença, o bebê parece normal ao nascer. As manifestações neurológicas iniciam entre seis horas e oito dias após o nascimento com letargia progressiva e hipotonia, levando a apneia e coma. Dentro de 24-48 horas após o primeiro sintoma, o paciente está flácido, completamente sem resposta aos estímulos e apnéico. A evolução da doença culmina em óbito, na maioria dos casos, nas primeiras semanas de vida. Os bebês sobreviventes apresentam uma profunda incapacidade intelectual e convulsões intratáveis (NYHAN, 2011; VAN HOVE, COUGHLIN, SCHARER, 2013; EL-HATTAB, 2015).

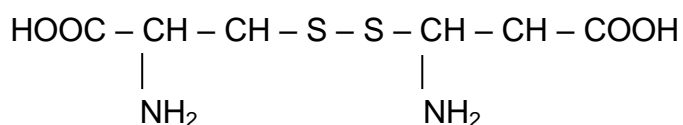
Altos níveis de glicina são encontrados nos fluidos biológicos, mas a concentração desse aminoácido no líquido cefalorraquidiano é bem mais alta em relação ao plasma, apresentando uma proporção liquor/plasma maior que 0,08 na forma neonatal. Portanto um aumento na concentração de glicina no líquido cefalorraquidiano juntamente com uma proporção liquor/plasma aumentada sugerem o diagnóstico (VAN HOVE, COUGHLIN, SCHARER, 2013; SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

No tratamento, as concentrações plasmáticas de glicina podem ser reduzidas por restrição dietética ou pela administração de benzoato de sódio. Não existe tratamento efetivo para a forma grave da doença. Evidências sugerem que transfusão ou diálise ou benzoato de sódio podem salvar a vida no período neonatal, mas muitas famílias, conscientes do prognóstico ruim, preferem não tomar essas medidas (VAN HOVE, COUGHLIN, SCHARER, 2013; NYHAN, 2011).

1.5.1.6. Cistinuria

A cistina é um derivado dissulfeto do aminoácido cisteína. O transporte anormal de cistina entre as células e o meio extracelular causa a cistinuria, um distúrbio hereditário do metabolismo (NADAI, 2006).

Figura 8 - Estrutura química da cistina.



A cistinúria possui significado clínico devido à insolubilidade da cistina. A excreção dos aminoácidos dibásicos ocorre sem conseqüências clínicas, mas a cistina é tão insolúvel que a formação de pedras no trato urinário de pacientes cistinúricos é muito comum. Elas podem induzir cólicas ou obstrução do trato urinário e podem exigir remoção cirúrgica. Infecções urinárias repetidas podem ser esperadas em qualquer paciente com litíase. Todos estes problemas podem levar à insuficiência renal (NYHAN, 2011).

O tratamento da cistinúria é a prevenção da cristalização da cistina na urina e a formação de cálculos, podendo ser minimizados pela diluição em volumes maiores de urina ou alterando a concentração de cistina, convertendo o aminoácido em um composto mais solúvel. A penicilamina é utilizada com esse propósito. Ela forma um composto com cisteína consideravelmente mais solúvel do que a cistina. Sua administração oral a pacientes com cistinúria pode reduzir as concentrações de cistina na urina em níveis nos quais as pedras não se formarão (NYHAN, 2011; NADAI, 2006).

Uma variedade de intervenções pode ser necessária em pacientes que desenvolvem cálculos. As infecções devem ser tratadas com antibióticos apropriados. Insuficiência renal pode levar a diálise ou transplante renal (NYHAN, 2011).

1.5.1.7. Cistinose

A cistinose foi descrita pela primeira vez em 1903 por Abderhalden em um relato de um paciente cujos depósitos de tecido foram identificados quimicamente como cistina (NYHAN, 2011).

Na cistinose clássica, o paciente parece normal ao nascer. A apresentação usual da doença é de seis a dez meses de idade com sintomas gerados por disfunção tubular renal tipo Fanconi, na qual há deficiência tubular renal na reabsorção de glicose, fosfato, aminoácidos e outros ácidos orgânicos, bem como de sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e água. A aminoacidúria é generalizada, com os aminoácidos normalmente encontrados na urina em quantidade moderada, excretada em quantidades muito grandes. Uremia e insuficiência renal são progressivas, levando geralmente à morte dentro dos primeiros dez anos de vida, se não tratadas (NYHAN, 2011).

A falta de estatura é típica na cistinose. O processo começa no primeiro ano. Uma criança de oito anos apresenta a altura similar a uma de quatro anos. Anormalidades oftálmicas são observadas em pacientes com cistinose, após o primeiro ano de vida, como corpos cristalinos na córnea, vistos por exame de lâmpada de fenda, retinopatia característica e úlcera corneana. A patologia da doença reflete a deposição extensa de cristais de cistina em todos os tecidos do corpo. Sua deposição no rim leva à nefropatia que caracteriza a doença (NYHAN, 2011; NESTEROVA, G., GAHL, W.A., 2016).

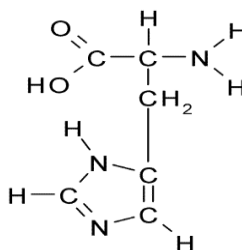
O diagnóstico precoce é pré-requisito para o sucesso da terapia. Os danos glomerulares, uma vez desenvolvidos, são irreversíveis (NYHAN, 2011).

Para tratamento, a cistina intracelular pode reagir com um composto tiol, sendo a cisteamina o mais eficaz, formando um composto mais solúvel. Muitos pacientes com cistinose nefropática são tratados com transplante renal e vivem 20 anos ou mais após o transplante (NYHAN, 2011).

1.5.1.8. Histidinemia

A histidinemia é uma doença autossômica recessiva do metabolismo da histidina provocada por uma deficiência de histidase, enzima que cataliza a conversão de histidina em ácido urocânico. Esta deficiência resulta em excreção urinária elevada de histidina e seus metabólitos, concentrações elevadas de histidina no sangue e líquido cefalorraquidiano e concentrações diminuídas de ácido urocânico no sangue e pele (SCRIVER, 2001; LEVY, 2004).

Figura 9 - Estrutura química da histidina



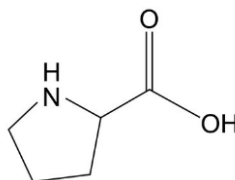
Na maioria dos pacientes com histidinemia, as manifestações parecem ser benignas, mas em alguns casos esse distúrbio pode causar danos no sistema nervoso central, como deficiência mental e dificuldade na fala (SCRIVER, 2001; LEVY, 2004).

O diagnóstico se baseia na quantificação da histidina em fluidos biológicos e a restrição da histidina da dieta resulta em diminuição dos níveis de histidina plasmática, mas não parece ser indicada para a maioria dos doentes, dada a aparente ausência de consequências clínicas (SCRIVER, 2001; LEVY, 2004).

1.5.1.9. Distúrbios da prolina

Prolina pode ser sintetizada a partir do glutamato e da ornitina.

Figura 10 - Estrutura química da prolina



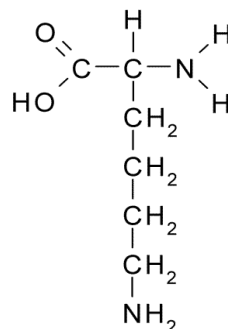
Há dois tipos de hiperprolinemias. A hiperprolinemia tipo I (HPI), causada pela deficiência da enzima prolina oxidase e a hiperprolinemia tipo II (HPII), caracterizada pela deficiência da enzima P5C desidrogenase. Na HPI, não há evidências que um erro inato seja responsável pelas manifestações clínicas já reportadas. Na HPII, há forte relação de um distúrbio metabólico com as manifestações neurológicas apresentadas pelos pacientes, como convulsões e retardo mental. As concentrações de prolina no sangue, urina e líquido cefalorraquidiano se apresentam elevadas (SCRIVER, 2001).

Não há indicações de tratamento para as hiperprolinemias. Mesmo nos casos de convulsões durante a infância, na vida adulta elas desaparecem. A restrição de prolina na dieta ajuda a controlar seus níveis nos fluidos biológicos (SCRIVER, 2001).

1.5.1.10. Distúrbios da lisina

Hiperlisinemia e a lisinúria são causadas pelo defeito na enzima α -aminoadipico-semialdeido sintase, sendo que sua atividade está reduzida a 10% do normal ou menos, nestes casos (SCRIVER, 2001).

Figura 11 - Estrutura química da Lisina



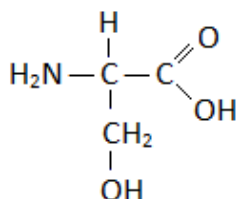
O diagnóstico é realizado após suspeita de um distúrbio metabólico, normalmente com sintomas neurológicos e retardo mental. A apresentação clínica inicial é um grande aumento de lisina no sangue e na urina, detectado pela análise de aminoácidos nos fluidos biológicos (SCRIVER, 2001).

Restrição de lisina na dieta ou substituição de proteína por uma mistura de aminoácidos, com exceção da lisina, reduzem os níveis desse aminoácido em sangue e urina (SCRIVER, 2001).

1.5.1.11. Distúrbios da Serina

Serina é um aminoácido não-essencial que possui importantes funções além de seu papel na síntese de proteínas. É um precursor de uma série de compostos, como a glicina, a cisteína, as esfingomielinas, entre outros. Possui um papel essencial no desenvolvimento neuronal. Deve ser sintetizado dentro do cérebro por causa de sua fraca permeabilidade através da barreira sangue-cérebro e a sua transferência para células neuronais é realizada por um transportador de aminoácidos (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Figura 12 - Estrutura química da serina



Sua apresentação clínica se caracteriza por restrição do crescimento fetal, microcefalia, dismorfia facial distinta, anomalias esqueléticas e letalidade perinatal.

As convulsões aparecem entre as primeiras semanas e meses de vida (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Os aminoácidos plasmáticos devem ser dosados em jejum e o diagnóstico é confirmado pela dosagem da atividade da enzima 3-fosfoglicerato desidrogenase em fibroblastos. O tratamento com administração do aminoácido serina tem um efeito benéfico sobre as convulsões, espasticidade, alimentação e comportamento (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

1.5.2 Acidemias / Acidúrias orgânicas

Acidemias orgânicas ou acidúrias orgânicas são caracterizadas pela excreção de ácidos orgânicos na urina. São causadas pela deficiência da atividade de uma enzima do metabolismo de aminoácidos, lipídios ou carboidratos, tendo como consequência o acúmulo tecidual de um ou mais ácidos carboxílicos, resultando em acidose metabólica. (EL-HATTAB, 2015; HOFFMANN, ZSCHOCKE, NYHAN, 2016). Os ácidos orgânicos também causam toxicidade da medula óssea que inibe a maturação de leucócitos e plaquetas, resultando em neutropenia e trombocitopenia (WEINER, 2010).

As acidemias orgânicas mais frequentes são acidemia propiônica, acidemia metilmalônica e acidemia glutárica (KARAM, 2001).

São normalmente diagnosticadas por cromatografia gasosa na urina ou pelo perfil de acilcarnitinas no sangue por espectrometria de massas. Na análise quantitativa de aminoácidos por HPLC, anormalidades inespecíficas, tais como hiperglicinemia e hiperalaninemia, estão presentes (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Os indivíduos assintomáticos provavelmente não necessitam de tratamento. Nos pacientes com crise metabólica, as terapias de glicina e carnitina são utilizadas para aumentar a excreção de conjugados de glicina e carnitina. São meios complementares de desintoxicação. O tratamento em longo prazo é realizado com base numa dieta ligeiramente restrita em proteínas (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

1.5.3 Distúrbios do ciclo da ureia

O ciclo da ureia é o principal mecanismo para a eliminação de nitrogênio residual resultante da degradação das proteínas e de outros compostos nitrogenados pela conversão da amônia em ureia. As desordens do ciclo da ureia resultam de defeitos nas enzimas deste ciclo, gerando acúmulo de amônia e outros metabólitos (WEINER, 2010; EL-HATTAB, 2015). São caracterizadas pela tríade hiperamoninemia, encefalopatia e alcalose respiratória (SCRIVER, 2001).

A deficiência de ornitina transcarbamilase (OTC) é herdada de forma ligada ao X, enquanto as outras são de forma autossômica recessiva (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

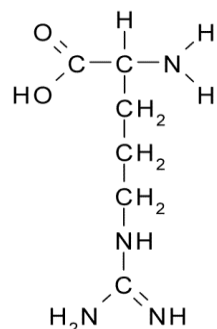
Amônia, em excesso, é uma neurotoxina que resulta em edema cerebral, bem como disfunção do tronco cerebral. Os recém-nascidos parecem saudáveis ao nascer, mas podem apresentar sintomas já nos primeiros dias de vida, como uma encefalopatia que evolui rapidamente. Outros com deficiência parcial só apresentam os sintomas nos primeiros meses de vida, ou mesmo como adultos, após ingestão de uma quantidade de proteína que excede sua capacidade metabólica (WEINER, 2010; SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

O curso clínico é muito semelhante à sepsis bacteriana, o que pode levar a atrasos significativos no início do tratamento específico para hiperamonemia. Os pacientes apresentam vômitos, recusa de alimentação, sonolência, hipotonia muscular, convulsões, coma. A alcalose respiratória é um achado inicial comum. O tratamento dos distúrbios do ciclo da ureia, de um modo geral, tem como objetivo minimizar a produção de amônia, utilizando dieta com restrição de proteínas (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Citrullinemia e acidúria argininosuccínica podem ser diagnosticadas com elevada precisão, aparentemente através da medição de citrulina, e também argininosuccinato. Por outro lado, a carbamoil fosfato sintetase e as deficiências de OTC não podem ser tão facilmente detectadas. O diagnóstico de deficiência de OTC tem sido descrito pela detecção de ácido piroglutâmico, derivados de glutamina (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

A argininemia, causada por uma ausência praticamente completa da atividade da enzima arginase, que catalisa a conversão de arginina em ureia e ornitina, é o único distúrbio do ciclo da ureia que pode ser detectada pela análise quantitativa de aminoácidos no sangue ou na urina, onde a arginina apresentará níveis bastante elevados. (NYHAN, 2011; SUTTON, GRAHAM, 2015).

Figura 13 - Estrutura química da Arginina



A terapia nutricional mantém os níveis de arginina dentro dos limites normais, e, conseqüentemente, promove o desenvolvimento neurológico normal. Os métodos empregados incluem restrição de proteína e o uso de misturas de aminoácidos, exceto a arginina (SCRIVER, 2001; NYHAN, 2011).

1.6 Investigação laboratorial dos erros inatos do metabolismo no período neonatal

A investigação e o diagnóstico precoce são extremamente importantes, pois muitas dessas doenças podem levar à deficiência mental grave, atrofia cerebral ou até mesmo à morte (KARAM, 2001; CLARKE, 2005).

Triagem Neonatal

A triagem neonatal é um programa de saúde pública voltado para a identificação precoce de distúrbios onde se espera que a intervenção oportuna resulte na eliminação ou redução da morbidade e da mortalidade (BURTIS, BRUNS, 2015).

É um programa multidisciplinar de medicina preventiva pediátrica, que depende de uma comunicação estruturada e rápida entre diferentes prestadores de cuidados da saúde, como laboratórios de triagem e confirmação de resultados, internações e ambulatorios responsáveis pelo tratamento de pacientes (HOFFMANN, ZSCHOCKE, NYHAN, 2016), pois quando há uma suspeita clínica de um EIM pela triagem neonatal, medidas de suporte gerais e investigações laboratoriais são realizadas simultaneamente, incluindo exames de imagem e eletrofisiológicos (WEINER, 2010; CARRAGHER, CHAMPION, 2014).

Os testes de triagem podem gerar alguns resultados falso-positivos ou indeterminados, particularmente para doenças relativamente raras. Também não detectam todos os distúrbios metabólicos. Por esses motivos, testes adicionais confirmatórios são necessários para conclusão do diagnóstico (BURTIS, BRUNS, 2015).

Triagem Seletiva

Quando um recém-nascido apresenta um resultado positivo na triagem neonatal, o programa normalmente encaminha o paciente para consulta com um especialista em metabolismo para investigação da doença (SUTTON, GRAHAM, 2015).

Os pacientes clinicamente pré-selecionados serão abordados pelo programa de triagem seletiva, que geralmente consiste na investigação e confirmação da suspeita de EIM's, além de realizar monitoramento dos pacientes já diagnosticados. Há também pacientes sintomáticos, que devem passar por essa investigação, apesar de apresentarem testes de triagem normais (BURTIS, BRUNS, 2015).

A triagem seletiva pode ser dividida em etapas, conforme mostra a Tabela 2. Se os testes iniciais (exames de primeira linha) apresentarem anormalidades ou se o paciente não apresentar melhora clínica com o tratamento inicial, outros exames mais específicos serão solicitados (exames de segunda linha). (BLAU, et al, 2008; WEINER, 2010; SUTTON, GRAHAM, 2015).

Tabela 2 - Protocolo de investigação laboratorial para EIM, segundo Weiner, 2010.

Material	Exames de primeira linha	Suspeita EIM	Exames de segunda linha	Identificação dos EIM
Sangue	Hemograma	Neutropenia, anemia ou trombocitopenia	Aminoácidos quantitativo (por HPLC ou MS/MS)	Aminoacidopatias, acidemias orgânicas, defeitos ciclo da ureia
	Dosagem dos eletrólitos (Na, K, Cl)	Acidose metabólica		
	Glicose	Hipoglicemia	Perfil de acilcarnitinas (MS/MS)	Acidemias orgânicas, deficiência de carnitinas
	Cálcio, Magnésio	Anormais		
	Transaminases, bilirrubina	todos elevados		
	Gasometria (pH, pCO ₂ , HCO ₃ , pO ₂)	Acidose metabólica	Piruvato, lactato	Desordens mitocondriais e da utilização dos carboidratos
	Amônia	Hiperamonemia		
	Ácido úrico	Anormal		
Lactato desidrogenase, aldolase, creatinaquinase	enzimas musculares anormais			
Urina	Odor, aspecto, pH	Anormais	Ácidos orgânicos	Aminoacidopatias, acidemias orgânicas, defeitos ciclo da ureia
	Cetonas	Se elevadas	Ácido Orotico	Defeitos ciclo da ureia
	substâncias redutoras	Se positivas	Acilglicinas	Acidemias orgânicas, defeito da oxidação dos ácidos graxos
	Ácido úrico	Anormal		

Fonte: Adaptado de WEINER, M.D, DEBRA, L., 2010.

O passo seguinte para diagnóstico confirmatório específico da maioria dos EIM's exige exames mais especializados para detecção de metabólitos anormais ou concentrações anormais de metabólitos no plasma, urina e/ou líquido cefalorraquidiano, como demonstração de deficiência enzimática na célula ou tecido apropriado, avaliação histoquímica de luz e/ou microscopia eletrônica de tecidos afetados ou a utilização de testes de DNA para confirmação de diagnóstico molecular (WEINER, 2010; SUTTON, GRAHAM, 2015).

Os testes enzimáticos podem ser tecnicamente difíceis, muitas vezes exigindo biópsias de tecido invasivo, além de poder ser limitado a apenas alguns laboratórios específicos de diagnóstico. Em contraste, o teste de mutações patológicas no gene de interesse requer apenas uma única amostra de sangue para

DNA, que pode ser obtida em praticamente qualquer ambiente médico (WEINER, 2010; SUTTON, GRAHAM, 2015). A análise de mutações está desempenhando um papel cada vez mais importante no diagnóstico dos EIM's, permitindo uma abordagem rápida e eficaz em termos de custos e tornando-se um pilar das vias de diagnóstico (CARRAGHER, CHAMPION, 2014).

A concentração de cada metabólito deve ser considerada, assim como a comparação com os valores de referência relacionados com a idade do paciente e em relação a outros constituintes. Em muitos casos, a interpretação final precisa de conhecimento tanto do quadro clínico e nutricional quanto das condições de amostragem (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

1.6.1 Evolução das técnicas laboratoriais de dosagem de aminoácidos

Nas últimas décadas, pode-se observar uma grande evolução na área de erros inatos do metabolismo, caracterizado pelo avanço tecnológico dos equipamentos que proporcionaram um crescimento exponencial do número de doenças identificadas. Percebeu-se, ao longo dos anos, que a análise simultânea dos aminoácidos e seus metabólitos são extremamente importantes para a compreensão das doenças metabólicas e neuronais (BREMER, et al., 1981; MAEDA, et al., 2016).

1.6.1.1. Teste de Guthrie

Em 1961, Guthrie descreveu a técnica para detecção de fenilcetonúria (PKU) em sangue coletado em papel filtro, um ensaio de inibição bacteriana baseado em testes microbiológicos, onde o aminoácido fenilalanina presente no sangue era colocado em gel de agar. A zona de crescimento era proporcional à concentração de fenilalanina no sangue (CLARKE, 2005; SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016). Embora tenha boa especificidade e acurácia, a desvantagem é que se detecta apenas um aminoácido por teste (BREMER, et al., 1981). Além disso, essa técnica apresenta apenas resultados semi-quantitativos. Assim sendo, outros testes capazes de detectar a concentração de vários aminoácidos simultaneamente foram

sendo desenvolvidos, apesar do Teste de Guthrie ainda ser mundialmente utilizado em laboratórios (CLARKE, 2005; BLAU, 2006).

1.6.1.2. Radioimunoensaios

Esta técnica tem como princípio geral uma reação de competição por um receptor comum entre uma substância a ser determinada e a mesma substância marcada radioisotopicamente. Utiliza-se neste método um leitor radiométrico, anticorpos radioativos, antígenos radioativos e a amostra a ser testada. Uma quantidade conhecida de um antígeno é tornada radioativa. Após uma reação de ligação antígeno-anticorpo, a radioatividade é medida utilizando um contador gama e assim determinando a quantidade de antígeno no soro do paciente (SUTTON, GRAHAM, 2015). Este método tem sido amplamente substituído por testes fluorimétricos ou imunoenzimáticos para evitar o uso de substratos radioativos. A sensibilidade deste método é alta, mas a proporção de falso-positivos também, tornando-se uma desvantagem a utilização dessa técnica (CLARKE, 2005).

1.6.1.3. Métodos fluorimétricos

Os testes fluorimétricos foram descritos pela primeira vez por McCaman e Robins em 1962 (SUTTON, GRAHAM, 2015). É um método quantitativo que se baseia na detecção da fluorescência pela reação do aminoácido com reagentes, sendo que, quanto maior a fluorescência, maior a concentração do aminoácido na amostra. Utiliza-se um equipamento específico (analisador) para detecção dessa fluorescência. As desvantagens são a baixa estabilidade dos reagentes e a contaminação por produtos e/ou vidraria, interferindo na leitura. Ainda utilizado por muitos laboratórios, essa técnica teve uma adaptação para o uso de microplacas, onde se permite lidar com um grande número de amostras (BLAU, 2006; SUTTON, GRAHAM, 2015).

1.6.1.4. Ensaio imunoenzimáticos

O uso de enzimas como ferramentas analíticas vem sendo introduzidas em laboratórios clínicos por vários anos por apresentarem maior especificidade.

O ensaio imunoenzimático é um método quantitativo em que a reação antígeno-anticorpo é monitorada pela medida da atividade enzimática. O seu princípio básico é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do anticorpo. A detecção ocorre pela reação do anticorpo ligado à enzima específica com o antígeno presente na amostra do paciente.

Desempenha um papel muito importante no laboratório clínico, pois, além da elevada sensibilidade comparável à do radioensaio, apresenta vantagens de utilizar reagentes estáveis, além de estar livre das exigências de se trabalhar com radioisótopos. Há diversos kits comerciais no mercado, sendo estes automatizados ou semi-automatizados. (CLARKE, 2005; SUTTON, GRAHAM, 2015).

1.6.1.5. Eletroforese

A eletroforese é uma técnica qualitativa baseada na separação de partículas em um determinado gel de acordo com sua massa e carga. Essas partículas são submetidas a um campo elétrico, na qual migram para um polo positivo ou negativo de acordo com a sua carga. O fluxo migratório é determinado pelo peso molecular, na qual moléculas de menor peso migram mais rápido que as de maior peso.

A eletroforese ocorre dentro de uma matriz ou gel que possibilita a corrida da amostra. O gel é introduzido dentro de uma solução tampão específica, que fornece as condições ideais para a passagem da corrente e a manutenção do valor do pH.

Com relação aos aminoácidos, o caráter anfótero destes permite que ajam como partículas carregadas e migrem na presença de um campo elétrico, conseguindo a separação dos analitos de interesse pela sua carga. Por terem estruturas diferentes, cada aminoácido se comportará de uma forma nessas condições, pois cada um possui seu ponto isoelétrico.

Apesar de ser rápida, essa técnica não consegue separar alguns grupos, como exemplos, leucina/Isoleucina e ornitina/lisina. Tem sido amplamente

substituída por cromatografia líquida de alta eficiência (BREMER, et al., 1981; SUTTON, GRAHAM, 2015).

1.6.1.6. Métodos Cromatográficos

O interesse de pediatras pelo estudo dos EIM cresceu a partir de 1940, simultaneamente ao surgimento da cromatografia em camada delgada (Thin Layer Chromatography - TLC) para aminoácidos. Na década seguinte, a quantificação de aminoácidos possibilitou novos diagnósticos. Os anos 70 e 80 trouxeram a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), impulsionando ainda mais as pesquisas nessa área do metabolismo (KARAM, 2001).

Na cromatografia em camada delgada, são realizadas as análises qualitativa e semi-quantitativa de um grande número de aminoácidos. Em alguns laboratórios, essa técnica é bastante utilizada para investigação de pacientes clinicamente pré-selecionados, com probabilidade de apresentarem distúrbios metabólicos (BREMER, et al., 1981; BLAU, 2006).

Se anormalidades são detectadas nas técnicas citadas anteriormente, utiliza-se o método quantitativo por cromatografia gasosa (CG) e por HPLC.

Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás e os analitos precisam ter volatilidade suficiente para serem transportados através da coluna. Além disso, os analitos precisam ser estáveis às altas temperaturas expostas no injetor e/ou na coluna. O gás (fase móvel) encaminha os analitos para o detector de acordo com a eluição de cada um deles. Geralmente a análise de ácidos orgânicos em urina é realizada por essa técnica (LUNDANES, 2013; BURTIS, BRUNS, 2015).

A técnica de HPLC para a análise de aminoácidos passou a ser empregada há mais de 40 anos e propiciou aplicações mais rápidas, mais reprodutíveis e, em alguns casos, mais sensíveis do que as cromatografias já citadas (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008). Atualmente é o método quantitativo mais utilizado para diagnóstico de erros inatos do metabolismo, pois além de sua rapidez e especificidade, permite

a quantificação simultânea de vários biomarcadores químicos, utilizando volumes mínimos de amostras (CONTRERAS, J. et al, 2015).

Um dos equilíbrios mais utilizados na HPLC é a troca iônica, que é bastante eficaz para análise de aminoácidos, onde o processo de separação ocorre por uma permuta de íons de mesmo sinal entre uma solução (fase móvel) e um corpo sólido insolúvel, a fase estacionária. Dessa forma, os diferentes graus de afinidade entre os íons e a fase estacionária, devido às diferenças de cargas, regem esse tipo de cromatografia (ARAÚJO, 2007; BURTIS, BRUNS, 2015). Este método fornece excelente separação e reprodutibilidade, com preparação mínima da amostra. A principal desvantagem da cromatografia de troca iônica é o tempo de análise muito prolongado, resultando em baixo rendimento. Além disso, particularmente em amostras de urina, a especificidade deste ensaio é afetada por metabolitos derivados de medicamentos ou suplementos dietéticos que interferem com a quantificação de aminoácidos (HELD, 2011).

Uma grande vantagem do sistema de HPLC para análise de aminoácidos é o seu custo operacional. Um instrumento de HPLC regular com uma coluna de fase reversa e um detector de fluorescência são suficientes. No entanto, uma desvantagem seria que a maioria dos agentes derivatizantes utilizados na preparação das amostras não reage quantitativamente da mesma forma com todos os aminoácidos (BLAU, DURAN e GIBSON, 2008).

1.6.1.7. Espectrometria de massas

Outra abordagem seria a utilização da técnica de espectrometria de massas. Essa técnica está sendo cada vez mais adotada na área de triagem neonatal para melhorar a acurácia e precisão das dosagens e é considerada um dos mais importantes avanços tecnológicos em diagnóstico de doenças metabólicas (CLARKE, 2005; BLAU, 2006). A sensibilidade do teste de espectrometria de massas é maior que a sensibilidade de qualquer outro teste bioquímico ou de inibição bacteriana para medir os níveis sanguíneos dos analitos (CLARKE, 2005). Além das aminoacidopatias, ela pode detectar também defeitos do metabolismo dos ácidos orgânicos e dos ácidos graxos. Pode ainda fornecer as sequências de

múltiplos segmentos polipeptídicos curtos (20 a 30 aminoácidos) numa amostra de proteína (SUTTON, GRAHAM, 2015; COX, 2013).

A grande vantagem é a identificação de múltiplos analitos, sendo mais precisa e específica quando comparada às outras técnicas de diagnóstico. No entanto, para a maioria dos laboratórios, esses exames são mais lentos e caros, portanto, como consequência, um método simples de triagem clínica se torna extremamente importante nestes locais antes de se iniciar investigações bioquímicas mais sofisticadas. (BLAU, 2006; SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

1.6.2 Aplicação do papel filtro para coleta de amostras biológicas

A utilização de amostras em papel filtro é amplamente aceita para testes de triagem. Um exemplo deste uso é o teste do pezinho, incorporado ao Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 1992 (Portaria GM/MS nº 22, de 15 de janeiro de 1992) (BREIER, 2014).

Robert Guthrie foi o primeiro a demonstrar que era possível colher o sangue de um recém-nascido, aplicá-lo em um papel filtro e transportá-lo a um laboratório para posterior análise de indicadores bioquímicos de algumas doenças. Suas primeiras publicações e o primeiro teste de triagem neonatal com amostras de sangue seco em papel filtro nos EUA foram realizados no início de 1960 (THERRELL, 2007).

Guthrie nasceu em 1916, em Missouri (EUA) e, em meados de 1950, foi apresentado ao Dr. Robert Warner, que o incentivou a desenvolver um método de identificação de fenilalanina em sangue. Esse foi o início da pesquisa em desenvolvimento de métodos para erros inatos do metabolismo, um ensaio de inibição bacteriana baseado em testes microbiológicos para fenilcetonúria (BLAU, 2006).

Durante aproximadamente 40 anos, Guthrie se dedicou à prevenção da deficiência mental causada por doença metabólica hereditária, particularmente a fenilcetonúria. Juntamente com seus colaboradores, ele passou a desenvolver ensaios de triagem bacteriana para galactosemia, doença de urina de xarope de

bordo, homocistinúria e outras doenças, embora nenhum tenha sido tão amplamente aplicado como o teste original para fenilcetonúria (POLLITT, 1995).

O próprio Guthrie previa que os avanços na tecnologia analítica acabariam por tornar obsoletos os ensaios bacterianos, mesmo para a detecção de fenilcetonúria, mas acreditava que a utilização do cartão de coleta de sangue em papel filtro permanecesse a característica central dos programas de triagem neonatal em todo o mundo (POLLITT, 1995).

A aplicação da coleta de amostras em papel filtro vem crescendo exponencialmente e são muitas as vantagens atribuídas a amostras biológicas processadas desta forma. Entre os principais encontram-se: fácil transporte, podendo ser enviado via correio em envelope convencional, sem necessidade de refrigeração (RODRIGUES, 2009); fácil armazenagem das amostras; técnica pouco invasiva, sendo necessário um menor volume de amostra; considerado um procedimento mais barato do que o convencional; segurança de manipulação das amostras por se tratar de um material seco e não líquido, o que diminui as chances de riscos de eventuais contaminações biológicas por parte do profissional que executa a análise (BREIER, 2014; DEMIREV, 2013). Segundo Chen (2014) e Velden (2013), dentre todas essas vantagens, a maior é que os analitos são bem mais estáveis em papel filtro do que em fluidos biológicos.

1.6.3 Interferências em análises

As análises de aminoácidos em líquidos corporais são influenciadas por vários fatores como idade, alterações fisiológicas, estado nutricional, medicações e toxinas (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008).

1.6.4 Idade

A idade exerce uma grande influência sobre os níveis de aminoácidos, quando se trata do período neonatal. Bebês prematuros podem ter funções hepática e renal subdesenvolvidas, conduzindo ao aumento da tirosina e a metionina no seu

plasma, bem como reforçada as perdas urinárias de cistina, lisina, glicina, prolina, hidroxiprolina, e cistationina (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008).

1.6.5 Nutrição

A nutrição pode ter um efeito considerável. Uma alta ingestão de proteína do leite em recém-nascidos pode resultar num aumento da maioria dos aminoácidos do plasma, especialmente metionina e tirosina. Fórmulas infantis enlatadas podem conter homocitrulina, que pode aparecer na urina do paciente. Desnutrição proteica grave leva à redução dos níveis plasmáticos dos aminoácidos essenciais, como fenilalanina, tirosina e lisina, além de um aumento concomitante em glicina, serina e prolina (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008).

1.6.6 Medicamentos

Podem causar interferentes que prejudicam a análise ou interromper o metabolismo normal de aminoácidos no corpo, sugerindo erros inatos do metabolismo, embora seja uma condição adquirida (SHIH, 2003).

1.7 Diagnóstico

Para a doença tratável, o objetivo principal da intervenção terapêutica é o diagnóstico precoce seguido imediatamente pelo tratamento, visando impedir o agravamento e a irreversibilidade dos sintomas, os danos neurológicos progressivos e os altos índices de mortalidade (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016). A Tabela 3 mostra as principais variações de concentrações de aminoácidos no sangue e suas respectivas interpretações.

Tabela 3 - Interpretação das principais variações de aminoácidos séricos em humanos.

AA	Variação da normalidade	AA relacionados	Outros fluidos	Diagnóstico
Alanina	↑	Gln, Pro, Gly		Hiperlactacidemia
Arginina	↑	Gln ±↑, Cit ±↓, Orn↓	U: ±↑	Def. de arginase
AACR	↑	Sem alle, outros aa±↓		Fome
	↑	alle +++ , Ala ↓	U: ↑	DXB
	↓	Met↑, Tyr↑		Problema hepático
Glicina	↑	Cit↑, cistina↑		Problema renal
		Sozinha	CSF↑, U↑	Hiperglicemia não cetótica
		Gln N, Ala↑, Lys↑	CSF N, U↑, UOA	Acidúria orgânica
Histidina	↑	Thr↑±	CSF: Gly ↑±, Thr ↑±	Def. Piridoxamina fosfato-redutase
		Sozinha	U ±↑	Def. Histidinase
Lisina	↑++	Sozinha		Def. desidrogenase sacaropina
	↑	Gln↑, NH ₃ ↑		Distúrbios do ciclo da ureia
Metionina	↓	Gln↓, NH ₃ ↑, Cit↑±		Piruvato carboxilase
		homocistina↑	U: Hcy2↑ sozinho	Metileno tetraidrofolato redutase
	↑	Hcy2↑, Cys2↓	UOA: ac. metilmalônico↑	Metabolismo da cobalamina
	↑	Tyr↑, AACR↓	U: homocistina↑	Def. cistationina -β-sintase
Fenilalanina	↑+++	Tyr↓		Fenilcetonúria
	↑±	Tyr ±↓		Def. síntese de biopterina
Prolina	↑	Sozinha	U: N ou ↑	Hiperprolinemia I
		Sozinha	U: N ou ↑, P5C↑	Hiperprolinemia II
		Ala↑		Hiperlactacidemia
Serina	↓	Todos os outros AA normais	CSF↓	Def. síntese de Serina
Tirosina	↑+++	Sozinha	U: ↑ sozinha	Tirosinemia tipo II
	↑	Met↑, AACR↓	UOA: succinilacetona ₀	Problemas hepáticos
		Met↑, AACR↓	UOA: succinilacetona ₊	Tirosinemia tipo I
Glutamina	↑	Ala ↑	UOA: normal	Def. N-acetyl glutamato desidrogenase
	↑	↑ Ala, ↓Cit, ↓Arg	UOA: normal	Def. Carbamoil fosfato sintetase
	↑	↑ Ala, ↑Cit, ↓ Arg	U: ↑	Citrulinemia tipo II

Legenda: Def.: Deficiência; Compostos: AA: aminoácidos; Ala: alanina; alle: aloisoleucina; Arg: arginina; AACR: Aminoácidos de cadeia ramificada (valina, isoleucina, aloisoleucina, leucina) ; Cit, citrulina; Cys2, cistina; Gln: glutamina; Gly: glicina; Hcy2: homocistina; Lys: lisina; Met: metionina; NH₃: amônia; Orn, ornitina; Pro: Prolina; Thr: treonina; Tyr: tirosina; P5C: Δ1-pirrolina-5-carboxilato. Fluidos: CSF: líquido cefalorraquidiano; U: urina; UOA: ácidos orgânicos na urina; Diagnoses: DXB: Doença da urina do xarope de bordo.

Fonte: SAUDUBRAY, J.M., BAUMGARTNER, M.R., WALTER, J.,2016.

No Brasil, foi criada em 2001, a Rede de Erros Inatos do Metabolismo (EIM), um projeto multicêntrico, coordenado pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - UFRGS, envolvendo diversos centros no Brasil, onde pacientes ligados ao Sistema Único de Saúde (SUS) com confirmação ou suspeita de doenças metabólicas são afiliados. Esta rede permitiu à genética, pediatria, neurologia infantil, entre outras clínicas de todo o país, investigar pacientes suspeitos de forma abrangente, com uma análise sofisticada de aminoácidos, ácidos orgânicos, acilcarnitinas, ácidos graxos e muitos outros metabólitos. Até 2015, a Rede EIM Brasil realizou 73.440 exames em 19.982 pacientes dos 27 estados brasileiros, tendo diagnosticado 698 casos de erros congênitos do metabolismo. Os casos mais frequentes de condições diagnosticadas foram acidemias orgânicas (19%), distúrbios peroxissômicos (17%), distúrbios de aminoácidos (16%), transtornos do metabolismo energético (13%), Distúrbios do metabolismo de carboidratos (8%) e defeitos do ciclo da ureia (6%) (GIUGLIANI, et al. 2016).

1.8 Tratamento

O tratamento de doenças genéticas requer diagnóstico preciso, intervenção precoce e profundo conhecimento do distúrbio, para que, em muitas doenças, se evite a morte ou sequelas permanentes nos pacientes (SCRIVER, 2001).

Muitas modalidades de tratamento são adotadas para gerenciar os EIM's, dependendo se a patologia resulta da deficiência do produto, da acumulação de um metabolito tóxico ou de uma combinação dos dois (CARRAGHER, CHAMPION, 2014). A terapêutica adequada das doenças metabólicas depende muito do erro inato do metabolismo responsável pela doença e da substância acumulada que está levando ao desequilíbrio bioquímico (EL HUSNY e FERNANDES-CALDATO, 2006). Portanto, a principal estratégia é a correção desse desequilíbrio, por meio do fornecimento de enzimas precursoras, que catalisam reações que iriam prosseguir a uma taxa muito reduzida na sua ausência e pela reposição do produto deficiente de uma via bloqueada (CARRAGHER, CHAMPION, 2014).

O uso de intervenções farmacológicas e nutricionais, procedimentos cirúrgicos e instrução dos pacientes são exemplos de tratamento (SCRIVER, 2001; CARRAGHER, CHAMPION, 2014).

Outra forma de tratamento é o transplante de órgãos. Isto envolve com maior frequência o fígado, pois este é o principal local de muitas vias metabólicas, como por exemplo, o ciclo da ureia (CARRAGHER, CHAMPION, 2014).

A correção de distúrbios de um único gene por terapia gênica, substituindo a cópia defeituosa do gene por uma cópia totalmente funcional, também é uma forma que está sendo utilizada e continua a ser a meta final para o tratamento de EIM's, podendo se tornar mais extensamente disponível no futuro (CARRAGHER, CHAMPION, 2014).

1.9 Determinação de valores de referência de analitos

O intervalo de referência é definido geralmente como uma faixa de valores onde 95% dos indivíduos normais estejam dentro desse intervalo, sendo que 5% deles se encontram abaixo ou acima dessa faixa de referência estabelecida (MCPHERSON, PINCUS, 2017; GITAKA, 2017).

Uma variedade de fatores pode influenciar os intervalos de referência. Diferentes métodos de laboratório frequentemente produzem resultados significativamente diferentes e, portanto, requerem intervalos de referência diferentes. Devido às diferenças de idade, antecedentes genéticos ou exposição a fatores ambientais, diferentes populações podem precisar de intervalos de referência diferentes para certos analitos laboratoriais. Por estes motivos, os laboratórios devem realizar seus próprios estudos para estabelecer intervalos de referência para todos os analitos envolvidos. Para assegurar a comparabilidade entre os valores de referência e os observados, deve ser utilizado o mesmo método analítico (SUTTON, GRAHAM, 2015; SHIH, 2003; MCPHERSON, PINCUS, 2017).

A Organização Internacional de Padronização para laboratórios clínicos, em inglês, International Organization and Standardization (ISO) preconiza que cada laboratório deve revalidar seus valores de referência periodicamente (OZARDA, 2016).

Os valores de referência são resultados de um determinado tipo de estudo, obtidos a partir de um grupo de indivíduos sistematicamente definidos de acordo com critérios pré-determinados. O grupo de indivíduos de referência deve ser uma amostra aleatória de todos os indivíduos da população que satisfazem os critérios de seleção e deve haver um consentimento por escrito de cada participante (BURTIS, BRUNS, 2015; OZARDA, 2016).

Idade e sexo são os critérios mais utilizados, pois vários analitos variam significativamente entre diferentes grupos de idade e sexo. A idade pode ser categorizada por intervalos iguais ou por intervalos mais estreitos nos períodos onde se observa uma maior variação. Além disso, o uso de grupos etários qualitativos, como por exemplo, neonatal, infância, adulto e geriátrico pode ser apropriado. O uso inapropriado de valores de referência pode resultar em erro de diagnóstico e de classificação da doença. Estabelecer esses valores corretamente é um desafio, principalmente para as faixas pediátrica e geriátrica, e deve ser cuidadosamente estratificado com relação à idade, etnia e sexo. Altura, peso, dieta e características ambientais também podem ser utilizadas como critérios para categorização de indivíduos (BURTIS, BRUNS, 2015; SIEST, 2013; GITAKA, 2017).

Recomenda-se uma padronização pré-analítica e analítica que envolva a preparação de indivíduos para coleta de amostras, o processo de coleta e a manipulação da amostra para análise, com o intuito de eliminar ou minimizar a variação desses fatores no estudo (BURTIS, BRUNS, 2015; OZARDA, 2016).

1.9.1 Intervalos de Referência e Limites de Decisão Clínica

Os termos limites de referência e limites de decisão clínica podem ser confundidos. Os limites de referência descrevem a distribuição de referência e fornecem informações sobre os valores de variação observados no grupo de indivíduos saudáveis selecionados. Em contraste, os limites de decisão clínica indicam sensibilidade à doença e proporcionam uma separação entre as categorias clínicas. Esses limites lidam com a decisão de tratar diferenciadamente indivíduos que apresentam valores abaixo ou acima dos valores de referência, portanto, são usados com o propósito do diagnóstico diferencial. Alternativamente, tais valores são

estabelecidos cientificamente com base em estudos de resultados e são usados como diretrizes clínicas para tratamento (MCPHERSON, PINCUS, 2017; OZARDA, 2016).

Definições comumente utilizadas na discussão de valores de referência incluem sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo (VPP e VPN) e a verificação da taxa de falso-positivos e falso-negativos (SUTTON, GRAHAM, 2015).

1.9.2 Sensibilidade e Especificidade

Sensibilidade e especificidade são medidas da precisão diagnóstica de um teste. Eles são indicadores da capacidade de um teste para distinguir entre doença e ausência de doença em um corte escolhido (MCPHERSON, PINCUS, 2017).

A sensibilidade é a capacidade de um teste para detectar a doença e é expressa como a proporção de pessoas com doença em quem o teste é positivo. Um teste que é sensível a 90% dará resultados positivos em 90% dos pacientes doentes e resultados falso-negativos em 10% dos doentes (MCPHERSON, PINCUS, 2017; SUTTON, GRAHAM, 2015).

Especificidade é a capacidade de detectar a ausência de doença e é expressa como a proporção de pessoas sem doença em quem o teste é negativo. Um teste que é 90% específico dará resultados negativos em 90% dos pacientes saudáveis e resultados falso-positivos em 10% dos pacientes sem doença. Um teste com maior sensibilidade identifica uma maior proporção de pessoas com doença e um teste com maior especificidade exclui uma maior proporção de pessoas sem doença (SUTTON, GRAHAM, 2015; MCPHERSON, PINCUS, 2017).

1.9.3 Alta sensibilidade e alta especificidade

Os resultados de falso-positivos (FP) e falso-negativos (FN) podem levar a erros de diagnóstico e manejo clínico inadequado com conseqüências clínicas e financeiras adversas. Um resultado FP pode causar a admissão desnecessária de um paciente, testes adicionais desnecessários e procedimentos invasivos. Da mesma forma, um resultado FN pode levar a uma liberação do paciente do

departamento de emergência, apesar da existência de uma doença. Na maioria das situações, o corte que delinea normal de anormal pode ser deslocado para reduzir o mais significativo das duas consequências (MCPHERSON, PINCUS, 2017).

Procedimentos de triagem menos caros e menos trabalhosos com alta sensibilidade são frequentemente usados em combinação com testes mais complexos e altamente específicos para confirmação. Em muitas combinações de triagem e testes de confirmação, este é altamente específico e altamente sensível, mas é inadequado usar como um teste de triagem devido ao custo ou complexidade do mesmo (MCPHERSON, PINCUS, 2017).

1.9.4 Tratamento estatístico

Após a análise das amostras, os valores obtidos devem ser submetidos a um tratamento estatístico que inclui a separação dos valores por grupos de acordo com idade, sexo ou outras características, verificação da distribuição de cada grupo, identificação de *outliers* e determinação dos intervalos de confiança (BURTIS, BRUNS, 2015; OZARDA, 2016).

As categorias de intervalos de referência incluem intervalo de tolerância, intervalo de predição e intervalo interpercentil. Este último é o mais comumente utilizado e o recomendado pelo IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry* (BURTIS, BRUNS, 2015; OZARDA, 2016).

O intervalo percentil tem sido determinado por métodos estatísticos paramétricos (cálculo da média e do desvio padrão - DP) ou não paramétricos (intervalo interquartil). É definido como um intervalo delimitado por dois percentis da distribuição de referência, baseado nos parâmetros da população estudada. Os limites de referência são determinados, neste caso, como sendo 2DP's abaixo e acima da média dos valores encontrados. Valores além de 2DP's implicam que o valor está além dos 95% central do intervalo de referência (BURTIS, BRUNS, 2015; GITAKA, 2017).

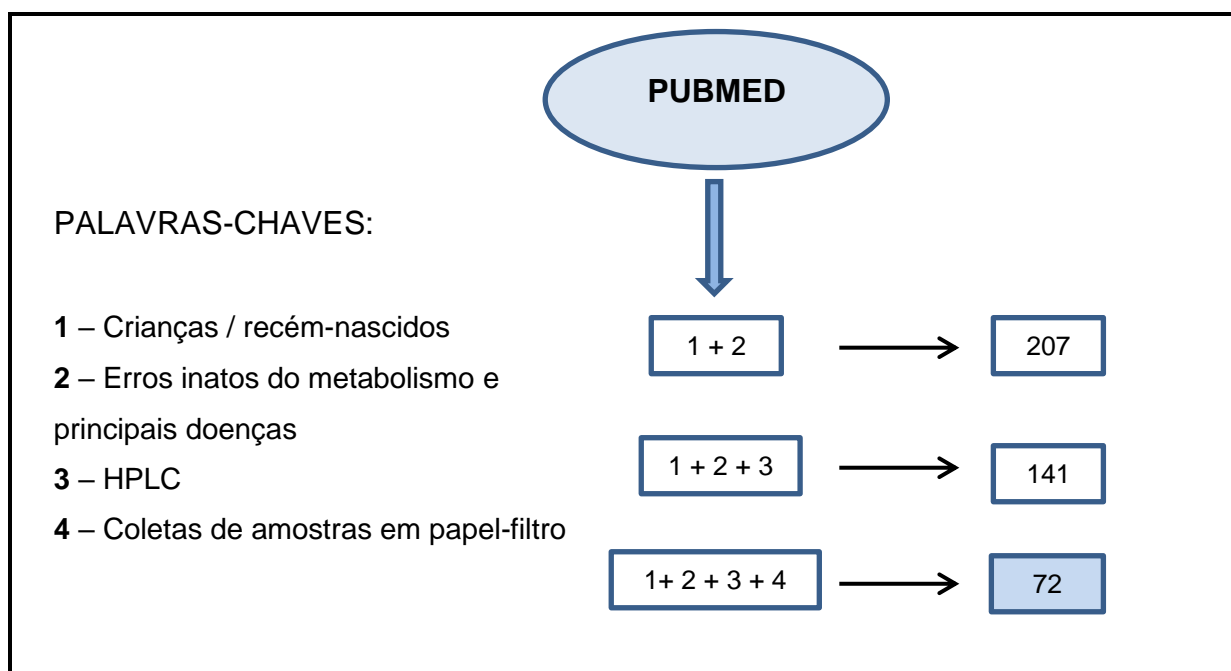
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estratégia para busca e seleção de informações

A revisão da literatura foi realizada com foco em três grandes grupos: erros inatos do metabolismo, crianças e a técnica de quantificação por HPLC. A estratégia de busca envolveu a base de dados Pubmed até junho de 2016. Fez parte da pesquisa também artigos relacionados ao estabelecimento de valores de referência em laboratórios clínicos.

Inicialmente, foram encontrados aproximadamente 32.000 artigos científicos sobre erros inatos do metabolismo. Ao especificar a metodologia utilizada para quantificação dos aminoácidos e adicionar a palavra-chave “crianças/recém-nascidos”, esse número foi reduzido a 141 artigos. Ao incluir o tipo de coleta em papel-filtro à pesquisa bibliográfica, foram selecionados 72 artigos científicos.

Figura 14 - Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos desse estudo. Dos 72 artigos selecionados (caixa em azul), 67 foram utilizados para a revisão.



3 JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (LEIM / HC-UFMG) tem realizado a análise semiquantitativa de aminoácidos em sangue em papel-filtro por cromatografia em camada delgada. Se o exame é alterado ou se o paciente apresenta uma forte suspeita de erro inato do metabolismo de aminoácidos ou ácidos orgânicos, o sangue e a urina são coletados em papel-filtro e encaminhados ao Instituto de Saúde Pública de Sapporo, no Japão, para análises quantitativas de aminoácidos por HPLC e análise de ácidos orgânicos por cromatografia gasosa. De 1999 a 2016, existiu uma cooperação técnica com esta instituição japonesa, onde os exames foram realizados sem ônus. Esta cooperação possibilitou o diagnóstico laboratorial de inúmeros erros inatos do metabolismo, que antes não eram conhecidos em Minas Gerais. Cooperamos também com a rede EIM Brasil, mas a vantagem do envio das amostras para o Japão era o uso de papel filtro.

Pacientes atendidos no Ambulatório de Erros Inatos do HC-UFMG com doença de xarope do Bordo, tirosinemia, acidúria metilmalônica, acidúria isovalérica, acidúria propiônica, acidúria glutárica e citrulinemia, entre outras patologias, já se beneficiaram desta cooperação internacional no diagnóstico, mas no controle de tratamento os resultados são demorados e as correções dietéticas necessárias têm sido sempre tardias, afetando a qualidade do controle. Pacientes com fenilcetonúria detectados na triagem neonatal estadual certamente também se beneficiariam de um controle regular dos aminoácidos no sangue, mas isto não é feito por falta de recursos técnicos.

Em relação à triagem neonatal no Brasil, apesar do Ministério da Saúde patrocinar gratuitamente o programa para cada bebê brasileiro, ele é limitado a apenas seis doenças (fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, distúrbios da hemoglobina, fibrose cística, deficiência de biotinidase e hiperplasia adrenal congênita). Infelizmente, a maioria dos EIM's acaba não sendo detectada em recém-nascidos, pois um programa de triagem mais abrangente está disponível apenas para os 25% da população, aqueles com seguro privado (GIUGLIANI et al. 2016).

Existe uma grande necessidade de se realizar no Brasil, gratuitamente, a triagem mais abrangente. O número de pacientes com diagnóstico de aminoacidopatias e acidemias orgânicas tem crescido pela possibilidade do apoio estrangeiro ao diagnóstico laboratorial, mas a demanda já exige que os exames sejam realizados no Sistema Único de Saúde (SUS).

A grande maioria da população do Brasil depende exclusivamente do SUS e ainda possui acesso limitado ao diagnóstico genético abrangente e tratamento, uma vez que ainda não há cobertura adequada de procedimentos médicos genéticos através deste sistema.

Em 2014, o SUS concebeu "A Política Nacional de Doenças Raras", estabelecendo diretrizes para oferecer tratamento a indivíduos afetados por doenças raras na rede unificada do sistema de saúde. Trata-se de uma política para doenças raras, que finalmente trará genética médica para o sistema público de saúde. Infelizmente, até agora a política não saiu da página impressa e ainda está dependendo da disponibilidade de fundos para ser efetivamente lançada (GIUGLIANI et al. 2016).

Não existem metodologia e valores de referência para a análise quantitativa de vários aminoácidos simultâneos em sangue e urina em papel-filtro por HPLC na nossa população, motivo da necessidade básica de se estabelecerem estes valores. A análise de aminoácidos em sangue e urina coletados em papel-filtro minimiza os efeitos de interferentes e facilita muito o transporte, que pode ser feito em envelope de carta. Cada concentração de aminoácidos de um dado fluido do corpo deve ser comparada com um intervalo de referência relevante, de preferência, construído no mesmo ambiente de laboratório (BLAU, DURAN, GIBSON, 2008).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estabelecer a análise quantitativa de aminoácidos em sangue e urina coletados em papel-filtro por HPLC com valores de referência no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e colocar à disposição da rede pública.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Otimizar e validar a metodologia para quantificação de aminoácidos em sangue e urina colhidos em papel-filtro.
- ✓ Estabelecer intervalos de referência para esses aminoácidos em nossa população, na faixa etária estudada, comparando com outros da literatura.
- ✓ Colocar à disposição da rede pública a análise quantitativa de aminoácidos por HPLC em sangue e urina em papel-filtro.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP-UFMG) sob o número ETIC – 0414.0.203.000.9 (Anexo III). Todos os pais ou responsáveis que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livremente Esclarecido (TCLE – Apêndice I).

5.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo longitudinal e prospectivo. Foram realizadas a otimização e a validação da metodologia para análise de aminoácidos por HPLC com detecção por fluorescência para determinação de valores de referência. Posteriormente foram analisadas amostras em sangue e urina coletadas em papel-filtro de recém-nascidos saudáveis do alojamento conjunto da maternidade do Hospital das Clínicas da UFMG. Todos os pais dos recém-nascidos foram devidamente informados sobre os objetivos da pesquisa.

5.3 Reagentes e solventes

Kit AccQ-Fluor (AQC, tampão borato-acetato e reagente de diluição) e padrão de aminoácidos foram adquiridos da empresa Waters® (Milford, MA, USA). Acetonitrila, metanol e ácido α -aminobutírico (AABA) foram comprados da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) e a solução salina 0,9% (m/v) adquirida comercialmente. Papel filtro PerkinElmer® (Waltham, MA, EUA) foi utilizado para as coletas de amostras.

5.4 Coleta e pré-tratamento da amostra

As amostras de sangue foram coletadas por meio de punção venosa, utilizando agulha ou lanceta, e aplicadas imediatamente nas áreas delimitadas do papel-filtro, sem sobreposição de gotas, como demonstrado na figura abaixo. As amostras de urina foram coletadas diretamente em papel-filtro colocado na fralda dos bebês.

Figura 15 - Coleta de sangue e urina em papel-filtro.



Após a coleta, o papel filtro foi colocado em um suporte para secagem, por um tempo mínimo de duas horas e sem exposição ao sol. Depois foi recolhido para armazenamento em geladeira no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo da UFMG até o momento da análise.

Os recém-nascidos foram avaliados por pediatras do Hospital das Clínicas da UFMG diariamente e foram selecionados para este trabalho aqueles que não apresentavam problemas de saúde ou tomavam medicamentos no momento da coleta (critérios de exclusão).

Esta amostragem foi realizada entre os meses de dezembro de 2016 e fevereiro de 2017. O método utilizado para pré-tratamento das amostras foi o preconizado pelo Instituto de Saúde Pública da cidade de Sapporo, Japão (YAMAGUCHI, et al. 1997).

5.4.1 Sangue em papel-filtro

No laboratório, as amostras foram picotadas em placas utilizando um picotador de 3,0 mm de diâmetro, conforme mostra a figura 16:

Figura 16 – Picotagem da amostra em placa. Picotador com diâmetro de 3,0 mm.



Foram adicionados 20,0 μL da solução metanol: acetona: água (70:70:20) para desnaturação da hemoglobina. As placas foram levadas à estufa a 37°C por 30 minutos. Após essa etapa, 20,0 μL de solução salina contendo o padrão interno (AABA), na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$, foram acrescentados às amostras para extração dos aminoácidos. Estas foram agitadas, em agitador mecânico, por 10 minutos, sob proteção da luz. Após esse período, 10,0 μL foram transferidos para ependorffs para início da reação de derivatização. Adicionou-se 70,0 μL do tampão borato e 20,0 μL do derivatizante, agitando em vórtex por 20 segundos. Após repouso de 1 minuto em temperatura ambiente para completa derivatização, todo o volume da amostra derivatizada foi transferido para os vials e estes colocados em banho-maria a 60°C por 10 minutos. Para análise, uma alíquota de 5,0 μL foi injetada no HPLC por injeção automática.

5.4.2 Urina em papel filtro

O papel filtro, contendo a urina, foi picotado em tiras em um tubo para facilitar a extração desta do papel. Adicionou-se 2,0 mL de água ultrapura, como demonstrado na figura abaixo, e o tubo foi armazenado por 48 horas, sob-refrigeração.

Figura 17 – Extração da urina com adição de água ultrapura e repouso por 48 horas.



Para validar a real concentração dos analitos em urina, é necessário expressar o resultado em relação à concentração de creatinina (YOKOYAMA, 2005). Portanto, após dosagem da creatinina pelo método cinético de dois pontos (kit Slides Crea Vitros Chemistry), a urina foi diluída em solução salina 0,9% (m/v) para uma concentração final de 25,0 µg/mL de creatinina e 10,0 µL do padrão interno (AABA 5,0 µg/mL) foi adicionado. Após essa etapa, 10,0 µL desta solução foram transferidos para ependorffs para início da derivatização. Adicionou-se 70,0 µL do tampão borato e 20,0 µL do derivatizante, agitando em vórtex por 20 segundos. Após repouso de 1 minuto em temperatura ambiente para completa derivatização, todo o volume da amostra derivatizada foi transferido para os vials e estes colocados em banho-maria a 60°C por 10 minutos. Para análise, uma alíquota de 5,0 µL foi injetada no HPLC por injeção automática.

5.5 Validação da metodologia

Foi utilizada a metodologia descrita por Yamaguchi, et al. (1997) para extração do sangue e urina do papel filtro e a metodologia AccQTag - Waters® para derivatização e análise dos aminoácidos.

Uma série de experimentos foi realizada com o intuito de otimizar a metodologia, como a eliminação de interferentes e separação dos analitos. Assim foram investigadas alterações no fluxo da fase móvel, temperatura da coluna, diferentes programas de gradiente da fase móvel, entre outros.

As análises das amostras coletadas foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo líquido, modelo *Alliance HT Waters e2795*®, com coluna em fase reversa *Nova-pak™ C₁₈* (3,9 x 150 mm, 4,0 µm) Waters®, acoplado a detector de fluorescência *Waters 2475*®.

Figura 18 – Cromatógrafo líquido modelo Alliance HT Waters.



A separação foi realizada utilizando-se um gradiente de concentração da fase móvel, conforme descrito na Tabela 4, utilizando como fase móvel A, um tampão acetato-fosfato (Eluente A – Waters®) e acetonitrila PA grau HPLC e água ultrapura, como B e C, respectivamente. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL e o sistema trabalhou sob temperatura controlada a 36°C. Os comprimentos de onda

utilizados para detecção foram 250 nm para excitação e 395 nm para emissão. Os dados foram registrados pelo software Empower, versão 3, Waters®.

Tabela 4 - Programa de gradiente de concentração da fase móvel utilizada no HPLC

Etapa	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%Tampão	%Acetonitrila	%Água
1	0	1	100	0	0
2	0,5	1	99	1	0
3	18	1	95	5	0
4	19	1	91	9	0
5	30	1	83	17	0
6	40	1	0	30	70
7	44	1	0	80	20
8	46	1	100	0	0

Para padronização do método, foi utilizado padrão Waters® grau HPLC de 17 L-aminoácidos, com concentração de 2500 nmol/mL para todos, com exceção da cistina, 1250 nmol/mL: Ácido Aspártico, Serina, Ácido Glutâmico, Glicina, Histidina, Arginina, Treonina, Alanina, Prolina, Cistina, Tirosina, Valina, Metionina, Lisina, Isoleucina, Leucina e Fenilalanina.

Foram realizados ensaios para a avaliação de linearidade, repetibilidade, limites de detecção e quantificação, efeito de matriz e recuperação. Após método validado, algumas amostras de sangue e urina de pacientes com alterações já confirmadas nas concentrações de aminoácidos foram testadas para verificação da metodologia e confirmação dos resultados.

5.5.1 Linearidade

A linearidade foi determinada utilizando o padrão grau HPLC Waters® contendo os 17 L-aminoácidos analisados, com concentração de 2500 nmol/mL, com exceção da cistina, que possui concentração de 1250 nmol/mL. A partir deste padrão, foi preparado uma série de padrões em 8 níveis de concentração, entre 100 e 2500 nmol/mL e, para a cistina, de 50 a 1250 nmol/mL. A curva analítica foi realizada com 8 pontos, todos em triplicata. Os coeficientes de determinação das curvas foram avaliados.

5.5.2 Repetibilidade

O estudo da repetibilidade foi realizado para verificar a dispersão dos resultados obtidos pelo método de análise. Para isso, foram utilizadas quatro concentrações de aminoácidos (200, 400, 600 e 800 nmol/mL) em papel filtro e em solução salina, preparados da mesma forma que para o cálculo da linearidade, em triplicata. Os resultados foram avaliados de acordo com o desvio padrão e o valor do coeficiente de variação (CV%) obtido para cada analito, que deve ser menor do que 15% para amostras biológicas, conforme preconizado pelo FDA (2013).

5.5.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente, quantificado. Para estimar o LD e o limite de quantificação (LQ), 10 replicatas do branco foram realizadas. A menor concentração dos analitos foi detectada e quantificada pela metodologia citada neste trabalho. A média dos valores (\bar{x}) e o desvio padrão (S) foram utilizados para o cálculo, de acordo com a fórmula preconizada pelo Inmetro (DOQ-CGCRE, 2011).

5.5.4 Efeito de matriz

Para a verificação do efeito de matriz, foi realizado o método de adição de padrão utilizando os padrões de 2500 nmol/mL de todos os aminoácidos em sangue seco em papel filtro. Este estudo é realizado a fim de minimizar o efeito da matriz, tornando possível e confiável a quantificação dos analitos.

À 300 μ L de amostra de sangue foram adicionadas concentrações diferentes dos aminoácidos, conforme tabela 5, que apresenta os dados referentes ao método de adição de padrão. A partir destes dados construiu-se uma curva analítica

relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas.

Tabela 5 - Adição de padrão em amostras para verificação do efeito de matriz.

Amostra	Volume adicionado da amostra (μL)	Conc. do padrão adicionado (nmol/mL)
1	300	0
2	300	25
3	300	50
4	300	75
5	300	100

5.5.5 Recuperação

A recuperação foi analisada pela dosagem de amostras fortificadas com quantidades conhecidas de aminoácidos em três níveis diferentes de concentrações, 100, 200 e 400 nmol/mL. O resultado final foi calculado pela diferença das concentrações da amostra fortificada e da não fortificada, dividido pelo valor da concentração adicionada.

5.5.6 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas no software StatSoft – Statistic, versão 7 (2004) e no programa SPSS, versão 18. Foi utilizado o gráfico de resíduos padronizados versus valor predito padronizado para verificação da hipótese de homocedasticidade dos modelos. O coeficiente de correlação de Spearman foi usado para verificar a linearidade do método.

Valor-p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Validação do método

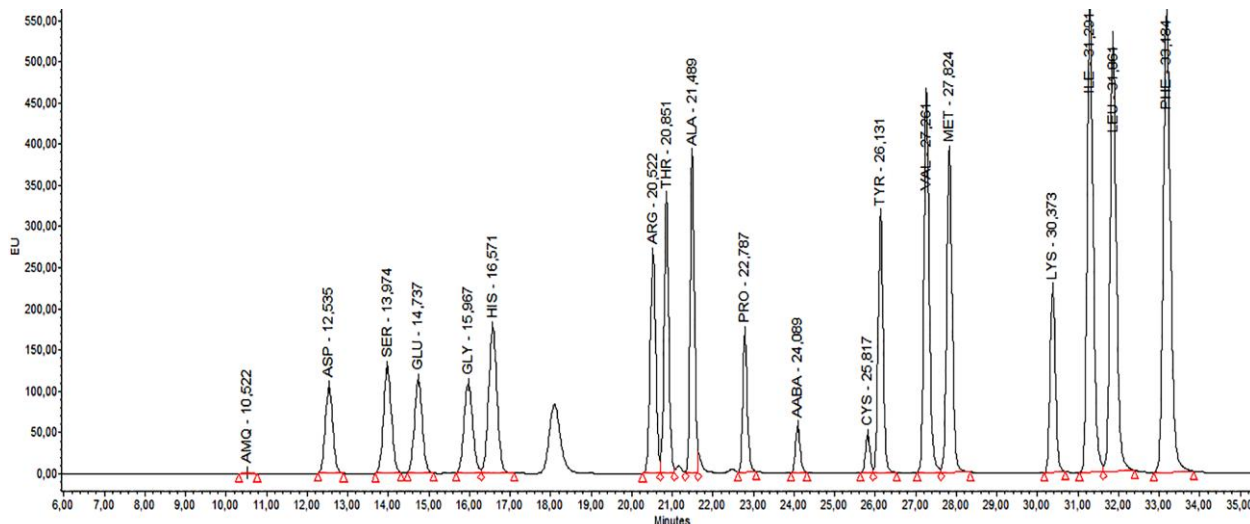
A quantificação de aminoácidos em fluidos biológicos é de grande importância em laboratório clínico e, portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que sejam precisos, reprodutíveis, sensíveis e eficientes.

Neste trabalho foram avaliados e determinados os seguintes parâmetros: linearidade, repetibilidade, limites de detecção e quantificação, efeito matriz e recuperação para a validação da metodologia de determinação de aminoácidos em sangue e urina coletados em papel filtro para o diagnóstico de aminoacidopatias.

As condições de separação foram estabelecidas conforme os tempos de retenção dos analitos de interesse, sempre comparados com o tempo de retenção do padrão interno (AABA). Segundo FDA (2009), em análises mais complexas e com pouco volume de amostra, é indispensável a utilização do padrão interno para a correta identificação dos analitos e eliminação de possíveis perdas durante o processo.

A Figura 19 mostra o perfil cromatográfico de 17 aminoácidos, com um tempo de corrida total de 36 minutos.

Figura 19 – Perfil cromatográfico de padrão de aminoácidos com concentração de 1000 nmol/mL.



Legenda: ASP: ácido aspártico, SER: serina, GLU: ácido glutâmico, GLY: glicina, HIS: histidina, ARG: arginina, THR: treonina, ALA: alanina, PRO: prolina, AABA: ácido α -aminobutírico, CYS: cistina, TYR: tirosina, VAL: valina, MET: metionina, LYS: lisina, ILE: isoleucina, LEU: leucina, PHE: fenilalanina.

Várias técnicas têm sido descritas para detecção e quantificação de aminoácidos, no entanto, HPLC ainda é a mais utilizada para essas análises na maioria dos laboratórios de países em desenvolvimento devido ao seu baixo custo, além de apresentar rapidez e grande sensibilidade (SHARMA, et al., 2014; KAND'AR, ZÁKOVÁ, 2009).

Ghoraba (2014) comparou em seu trabalho três métodos diferentes para detecção de alguns aminoácidos e concluiu que a técnica de HPLC é mais rápida, possui baixo custo e é mais fácil de ser executada com relação à preparação das amostras quando comparada à cromatografia gasosa e à cromatografia líquida, ambas acopladas ao espectrômetro de massas, CG-MS/MS e LC-MS/MS, respectivamente.

Neste trabalho, a preparação e a derivatização das amostras são etapas simples e rápidas, mas uma das grandes vantagens do método é a utilização do 6-aminoquinolyI-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) como derivatizante, pois o produto final gerado (aminoácidos derivatizados) se torna bastante estável, sendo possível armazená-lo por até uma semana. Isso não acontece quando se utiliza outros

derivatizantes, como o citado por Fekkes (1996) e Cruz (2016), onde o orto-phthalaldeido (OPA) é empregado na derivatização, deixando o produto final instável, podendo ser convertido rapidamente em produtos degradados não fluorescentes.

As principais razões de se utilizar um método com derivatização são o aumento da sensibilidade e especificidade, com baixo nível de ruído, uma melhor resolução dos analitos de interesse, análises mais rápidas, utilizando menos reagentes e assim, diminuindo o custo do processo (DEMIREV, 2012; SHARMA, et al. 2014).

Cohen e Michaud (1993) introduziram o 6-aminoquinolyl-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) como um reagente derivatizante em 1993. Embora na literatura outros derivatizantes sejam citados, este apresenta maiores vantagens, como sua reação com ambos os aminoácidos primários e secundários, grande estabilidade dos aminoácidos derivatizados e ótima resposta com relação à intensidade de fluorescência (SHARMA, et al., 2014; SEO, 2005).

Para melhor separação dos 17 aminoácidos, o fluxo contínuo de fase móvel foi substituído por um sistema de gradiente de concentração, o que está de acordo com o reportado por outros autores (DALE, et al., 2003; PECCE, et.al., 2013, HARIHARAN, et al.,1993, CRUZ, et al., 2016).

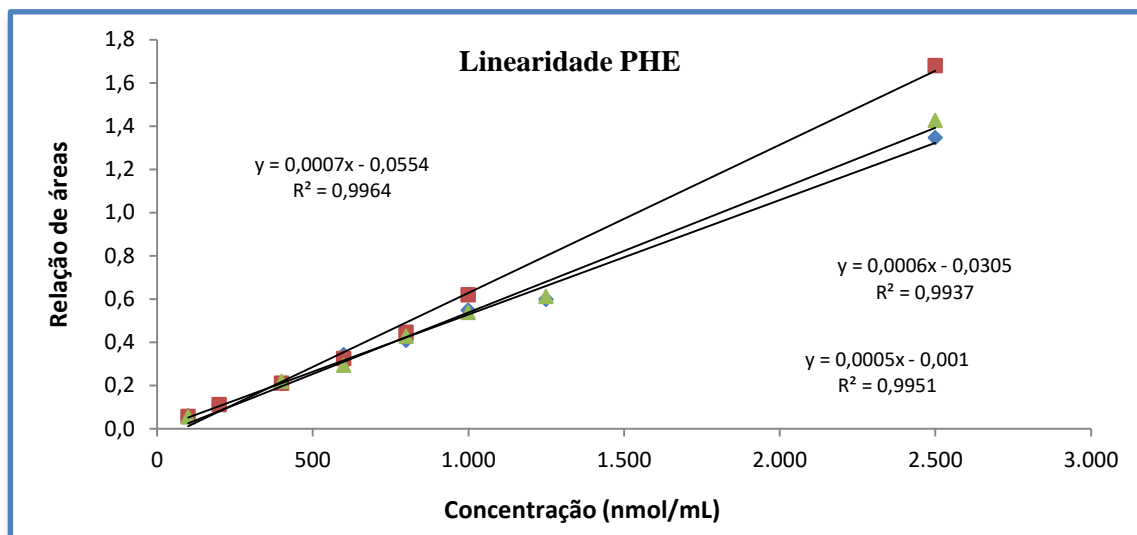
6.1.1 Linearidade

Para analitos que são compostos endógenos, a precisão da medição representa um desafio quando o ensaio não pode distinguir entre o analito adicionado e o endógeno. Em tais situações, a matriz biológica utilizada para preparar os padrões de calibração deve ser a mesma que as amostras de estudo, mas livre do analito endógeno (FDA, 2013). Seguindo essa recomendação, utilizamos o papel filtro e a solução salina 0,9% (m/v) para validar e monitorar o desempenho do ensaio para sangue e urina, respectivamente.

Para as amostras em papel filtro, o resultado mostrou um ótimo ajuste dos dados obtidos para a linha de regressão para os aminoácidos ácido glutâmico, glicina, histidina, treonina, prolina, tirosina, metionina, lisina, isoleucina, serina,

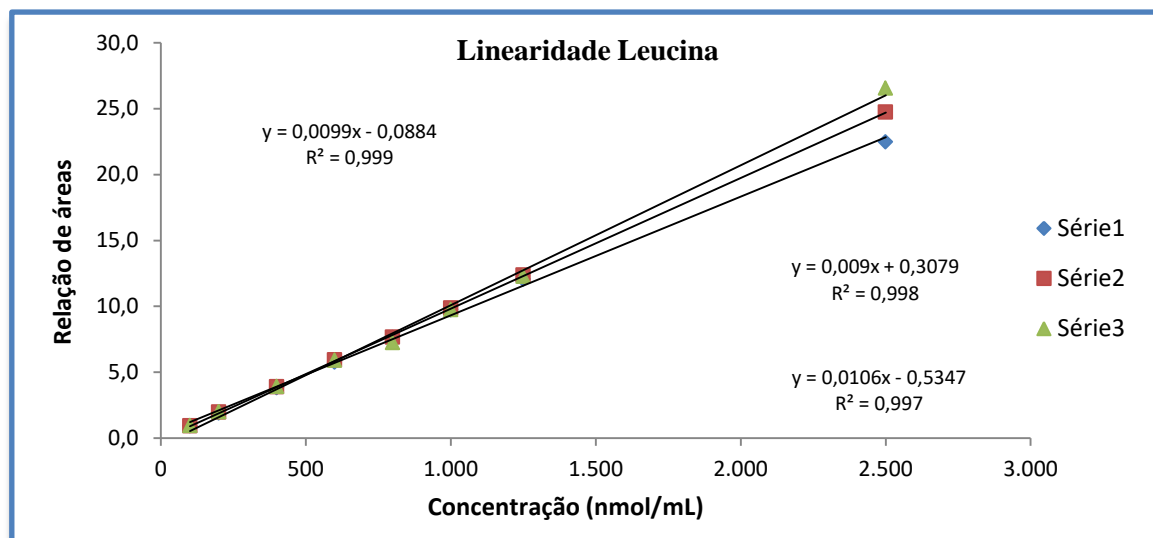
valina, leucina e fenilalanina, obtendo um R^2 maior que 0,99, como demonstrado na Figura 20 e na Tabela 11, no Anexo I.

Figura 20 - Linearidade para Fenilalanina (PHE) em papel filtro. Amostras realizadas em triplicata.



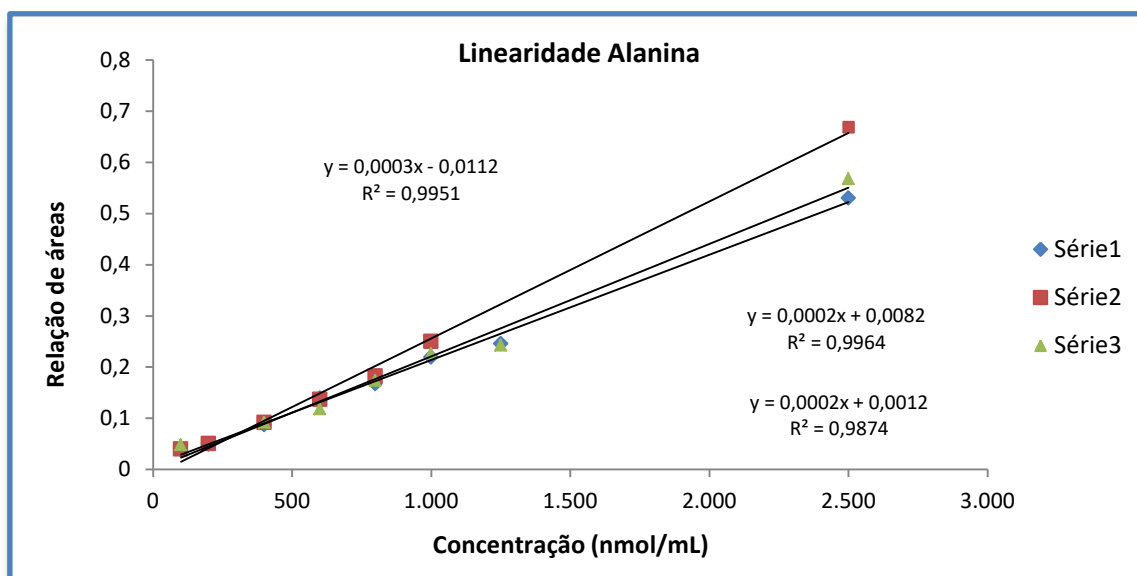
Para as amostras em solução salina 0,9% (m/v), um excelente ajuste foi obtido para os aminoácidos ácido glutâmico, glicina, histidina, arginina, treonina, prolina, cistina, metionina, isoleucina, serina, valina, leucina e fenilalanina, obtendo um R^2 maior que 0,99, conforme abaixo na Figura 21 e na Tabela 12 (Anexo II).

Figura 21 - Linearidade para Leucina em solução salina 0,9% (m/v). Amostras realizadas em triplicata



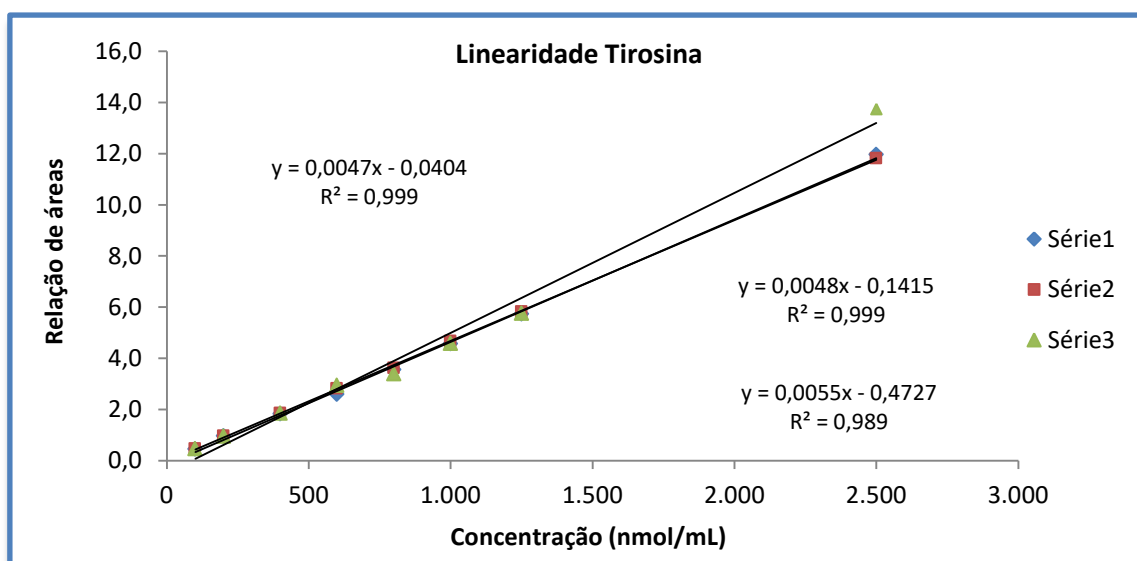
Um coeficiente de correlação menor que 0,99 foi obtido nas amostras em papel filtro para os aminoácidos ácido aspártico ($R^2=0,989$), alanina ($R^2=0,987$), cistina ($R^2=0,986$) e arginina ($R^2=0,989$), mas apenas em uma das três replicatas realizadas, como mostra a Figura 22.

Figura 22 - Linearidade para Alanina em papel filtro. Amostras realizadas em triplicata.



Nas amostras realizadas em solução salina, obtivemos os mesmos resultados para os aminoácidos ácido aspártico ($R^2 = 0,971$), alanina ($R^2 = 0,986$), tirosina ($R^2 = 0,989$) e lisina ($R^2 = 0,983$), também apenas em uma das três replicatas realizadas, como observado na Figura 23.

Figura 23 - Linearidade para Tirosina em solução salina. Amostras realizadas em triplicata.



Autores como Sharma (2014), Wada (2014) e Cruz (2016) apresentaram coeficiente de determinação semelhante ao encontrado nesse trabalho ($R^2 > 0,99$). Nos casos em que obtivemos o coeficiente de determinação menor do que 0,99, foi observado que foram resultados aleatórios e em apenas uma das três replicatas realizadas, o que pode ser devido a um erro de preparação ou derivatização da amostra, já que nas outras duas replicatas, a linearidade foi adequada.

6.1.2 Repetibilidade

Para todos os níveis de concentração dos aminoácidos, o método apresentou boa resposta, com CV intra-dia menor que 9,4% para amostras em papel filtro e menor que 11,0%, em solução salina (Tabela 6), o que está de acordo com o preconizado pelo FDA (2013), onde o CV não deve exceder o valor de 15%.

Sharma, et al. (2014) realizou um trabalho semelhante, analisando os 17 aminoácidos citados nesse estudo em plasma e obteve também boa repetibilidade, com CV intra-dia máximo de 10,13%, próximo ao valor máximo encontrado nesse trabalho, que foi de 11,0%. Fu, et al. (2000) obteve em seu trabalho CV's(%) maiores para alguns aminoácidos em urina, sendo o menor CV, com valor de 5,5%, para fenilalanina, 7,7% para leucina, 8,3% para alanina e 10,9% para a cistina, valor próximo ao encontrado neste estudo para este mesmo analito (11,0%).

Tabela 6 - Repetibilidade do método para amostras em papel-filtro e em solução salina 0,9 % (m/v).

	400 nmol/mL				600 nmol/mL				800 nmol/mL				1000 nmol/mL			
	Média PF	Média solução	CV PF (%)	CV sol (%)	Média PF	Média solução	CV PF (%)	CV sol (%)	Média PF	Média solução	CV PF (%)	CV sol (%)	Média PF	Média solução	CV PF (%)	CV sol (%)
ASP	0,042±0,001	0,921±0,011	1,9	1,2	0,062 ± 0,005	1,423 ± 0,053	8,3	3,7	0,085 ± 0,004	1,815 ± 0,036	4,5	2,0	0,116 ± 0,008	2,301 ± 0,040	6,9	1,8
SER	0,054±0,003	1,184±0,012	4,8	1,0	0,079 ± 0,007	2,004 ± 0,015	9,4	0,7	0,106 ± 0,006	2,340 ± 0,021	5,2	0,9	0,145 ± 0,009	3,033 ± 0,028	6,4	0,9
GLU	0,045±0,001	1,042±0,004	2,7	0,4	0,068 ± 0,005	1,584± 0,057	6,8	3,6	0,093 ± 0,005	2,035 ± 0,062	5,3	3,0	0,127 ± 0,009	2,629 ± 0,017	6,9	0,7
GLY	0,048±0,002	1,084±0,008	4,1	0,7	0,071 ± 0,005	1,752±0,053	6,9	3,0	0,100 ± 0,005	2,138± 0,062	5,3	2,9	0,134 ± 0,010	2,753 ± 0,032	7,7	1,2
HIS	0,070±0,001	1,708±0,014	1,5	0,8	0,102 ± 0,006	2,628 ± 0,039	6,3	1,5	0,145 ± 0,007	3,309 ± 0,046	4,8	1,4	0,197 ± 0,016	4,366 ± 0,058	8,2	1,3
ARG	0,091±0,000	1,727±0,026	0,3	1,5	0,131± 0,009	2,671 ± 0,065	7,1	2,4	0,172 ± 0,009	3,392 ± 0,068	5,5	2,0	0,232 ± 0,016	4,383 ± 0,094	6,9	2,1
THR	0,085±0,002	1,882±0,025	2,5	1,3	0,127± 0,009	2,961 ± 0,029	7,9	1,0	0,170 ± 0,009	3,714 ± 0,058	5,1	1,6	0,232 ± 0,017	4,744 ± 0,084	7,0	1,8
ALA	0,090±0,003	1,973±0,010	2,9	0,5	0,132 ± 0,011	3,113 ± 0,037	8,7	1,2	0,174 ± 0,008	3,898 ± 0,086	4,3	2,2	0,236 ± 0,016	4,923 ± 0,079	6,8	1,6
PRO	0,037±0,001	0,899±0,008	2,2	0,9	0,056 ± 0,004	1,373 ± 0,033	7,6	2,4	0,074 ± 0,003	1,774 ± 0,019	4,5	1,1	0,101 ± 0,008	2,280 ± 0,030	8,3	1,3
TYR	0,094±0,005	1,850±0,012	5,1	0,6	0,145 ±0,010	2,887 ± 0,181	6,7	6,3	0,188 ± 0,008	3,589 ± 0,116	4,4	3,2	0,257 ± 0,020	4,616 ± 0,051	7,9	1,1
CYS	0,010±0,000	0,242±0,001	1,1	0,5	0,015 ± 0,001	0,360 ± 0,039	5,6	11,0	0,020 ± 0,001	0,456 ± 0,027	5,4	6,0	0,030 ± 0,002	0,618 ± 0,011	7,3	1,7
VAL	0,124±0,002	2,960±0,033	1,9	1,1	0,183 ± 0,015	4,562 ± 0,113	8,2	2,5	0,243 ± 0,009	5,792 ± 0,049	3,5	0,9	0,334 ± 0,024	7,420 ± 0,070	7,3	0,9
MET	0,089±0,002	2,501±0,031	2,0	1,2	0,140 ± 0,011	3,844 ± 0,137	7,5	3,6	0,190 ± 0,008	4,907 ± 0,056	4,1	1,1	0,261 ± 0,023	6,287 ± 0,070	8,9	1,1
LYS	0,057±0,002	1,381±0,007	2,8	0,5	0,081 ± 0,006	2,014 ± 0,120	7,9	6,0	0,112 ± 0,004	2,622 ± 0,190	3,8	7,2	0,155 ± 0,011	3,448 ± 0,028	7,1	0,8
ILE	0,163±0,009	3,968±0,046	5,4	1,2	0,241 ± 0,019	6,068 ± 0,113	7,8	1,9	0,323 ± 0,015	7,809 ± 0,222	4,7	2,8	0,441 ± 0,035	10,024 ± 0,091	8,0	0,9
LEU	0,155±0,003	3,865±0,048	2,2	1,2	0,228 ± 0,015	5,887 ± 0,085	6,8	1,4	0,306 ± 0,015	7,609 ± 0,229	4,9	3,0	0,420 ± 0,031	9,774 ± 0,070	7,4	0,7
PHE	0,213±0,006	4,670±0,064	2,7	1,4	0,320 ± 0,024	7,326 ± 0,236	7,6	3,2	0,427 ± 0,019	9,226 ± 0,259	4,3	2,8	0,582 ± 0,044	11,963 ± 0,156	7,6	1,3

Legenda: ASP: ácido aspártico, SER: serina, GLU: ácido glutâmico, GLY: glicina, HIS: histidina, ARG: arginina, THR: treonina, ALA: alanina, PRO: prolina, AABA: ácido α -aminobutírico, CYS: cistina, TYR: tirosina, VAL: valina, MET: metionina, LYS: lisina, ILE: isoleucina, LEU: leucina, PHE: fenilalanina; CV PF: coeficiente de variação em papel filtro; CV sol: coeficiente de variação em solução; PF: papel filtro.

6.1.3 Limites de Detecção e de Quantificação

O LD determinado foi de 1,0 nmol/mL e o LQ, calculado como 3 vezes o LD, foi de 3,0 nmol/mL para todos os aminoácidos. A sensibilidade encontrada neste trabalho pode ser comparada com outros, como Pecce, et al. (2013), que obteve valor de 0,5 nmol/mL para tirosina e 0,1 nmol/mL para fenilalanina, Sharma, et al. (2014) que apresentou o valor de 2,0 nmol/mL para todos os aminoácidos e Kand'ar, Zaková (2009), com LD de 1,0 nmol/mL para tirosina e 3,0 nmol/mL para fenilalanina. Seo (2005) trabalha com o mesmo derivatizante utilizado nesse estudo (AQC) e o limite de detecção encontrado pelo autor para os aminoácidos foi de 0,3 nmol/mL.

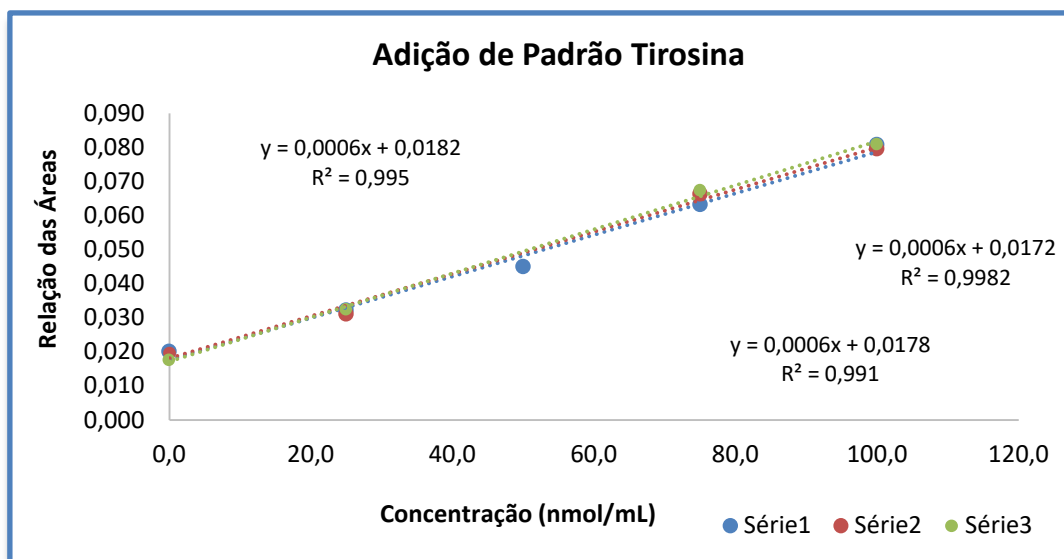
Quando a concentração for maior do que o limite superior, uma diluição simples pode ser realizada para a possível quantificação dos analitos.

6.1.4 Efeito matriz

Um dos grandes problemas encontrados na técnica analítica para a determinação de aminoácidos em fluidos biológicos é a necessidade de adição de padrão, a fim de minimizar o efeito de matriz, tornando possível e confiável a quantificação dos analitos (ALCANTARA, 2012).

Portanto, para verificar o efeito de matriz, foi realizado o método de adição de padrão utilizando os padrões de 2500 nmol/mL de todos os aminoácidos em papel filtro e construída a curva, conforme Figura 24.

Figura 24 - Curva analítica pelo método de adição de padrão. Estudo do efeito de matriz para a tirosina. Testes realizados em triplicata.



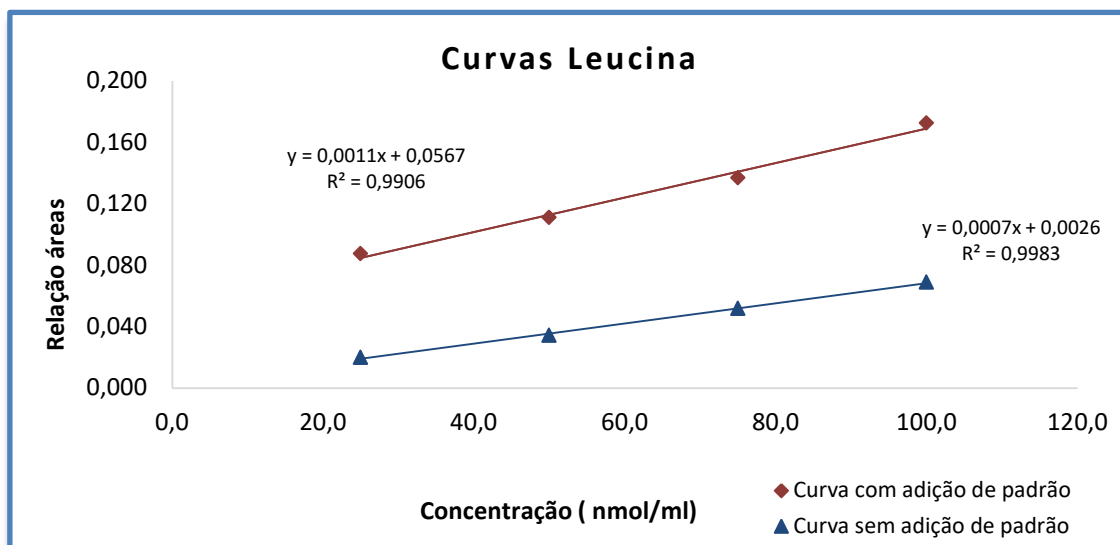
As concentrações dos aminoácidos nas amostras pelo método de rotina e pelo método de adição de padrão são demonstradas na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentrações (nmol/mL) das amostras no estudo do efeito de matriz.

Aminoácido	Concentração Inicial	Concentração Real
Aspartato	280,93	388,88
Serina	285,15	429,18
Glutamato	187,90	239,04
Glicina	590,48	755,03
Histidina	255,73	478,97
Arginina	106,79	139,49
Treonina	279,45	296,35
Alanina	574,76	796,54
Prolina	245,68	370,63
Cistina	4,52	8,25
Tirosina	98,42	106,41
Valina	341,51	483,40
Metionina	40,15	65,49
Lisina	312,94	423,50
Isoleucina	102,03	174,28
Leucina	215,01	325,58
Fenilalanina	122,65	146,67

Comparando as curvas analíticas obtidas pelo método de rotina e pelo método de adição de padrão, obteve-se o gráfico representando pela Figura 25, onde se identifica a diferença entre as concentrações das amostras nos dois métodos utilizados.

Figura 25 – Comparação das curvas analíticas pelos métodos de rotina e de adição de padrão. Estudo do efeito de matriz para a leucina.



Ficou constatado que há o efeito de matriz nessa metodologia para todos os aminoácidos, pois houve uma discrepância entre os resultados obtidos pelo método de rotina e pelo método de adição de padrão para esses analitos.

6.1.5 Recuperação

A faixa de recuperação encontrada neste estudo foi de 80 a 100%, o que está de acordo com outros estudos como Pecce (2013) e Jeong (2011).

Para três dos aminoácidos avaliados, glicina, arginina e cistina, a recuperação apresentou valores mais baixos, próximos de 70%, conforme tabela abaixo.

Tabela 8 - Recuperação das amostras de aminoácidos em papel filtro

Aminoácido	Recuperação (%)
Aspartato	86,7
Serina	80,2
Glutamato	91,2
Glicina	74,3
Histidina	94,0
Arginina	71,0
Treonina	87,5
Alanina	82,3
Prolina	91,0
Cistina	71,3
Tirosina	97,9
Valina	81,5
Metionina	97,7
Lisina	79,9
Isoleucina	94,6
Leucina	83,9
Fenilalanina	93,4

Wada (2014) e Febriani (2004) também citam valores baixos de recuperação para alguns aminoácidos, como 74,3% para metionina e 69% para cisteína, respectivamente.

Os autores acreditam que essa baixa recuperação seja pela extração incompleta das amostras do papel filtro. Além disso, nosso estudo trabalha com volumes muito pequenos de amostras e reagentes, o que pode afetar ainda mais a completa extração. Maeda (2016) encontrou em seu estudo, uma faixa de recuperação entre 70 e 120%, e afirma ser aceitável de acordo com o preconizado pelas diretrizes do FDA (2009).

Mesmo com uma recuperação não muito alta, o método é aceitável desde que demonstre ter sensibilidade, precisão e exatidão adequadas (FDA, 2009). Camargo (2008) diz que valores de recuperação próximos a 100% são desejáveis, mas valores acima de 60% são aceitáveis, desde que sejam exatos e precisos.

6.1.6 Análise estatística

Realizando o estudo do gráfico dos resíduos padronizados versus valor predito padronizado e o coeficiente de correlação de Spearman, verificou-se que os pontos dos gráficos se apresentaram de forma aleatória e entre os limites do valor residual padronizado, concluindo-se que os modelos são homocedásticos.

6.2 Quantificação dos aminoácidos em sangue e urina coletados em papel filtro em recém-nascidos

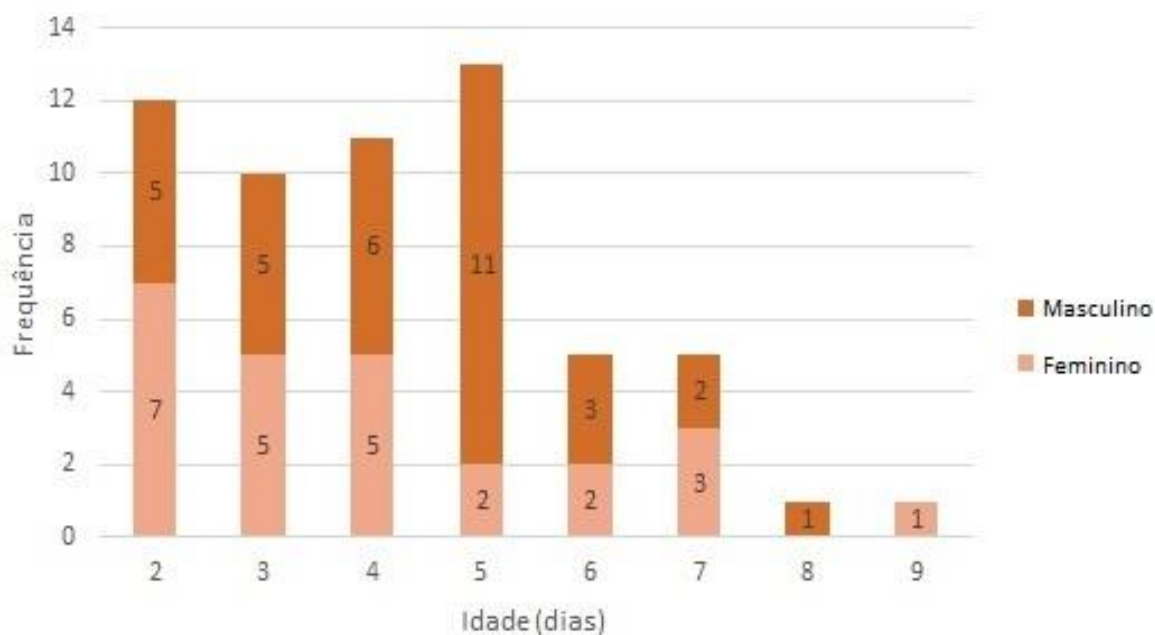
As concentrações dos aminoácidos foram determinadas para amostras de 58 recém-nascidos em sangue e 45 recém-nascidos em urina, ambas coletadas em papel filtro. Todos os voluntários são saudáveis, com idades entre 2 e 9 dias e peso ao nascimento entre 1,7 a 4,4 kg.

O número de pacientes incluído na determinação do valor de referência para aminoácidos em sangue e urina em papel filtro é semelhante ao de outros estudos descritos em literatura, como Shawky, et al. (2015), Cruz, et al. (2016) e Strauss, et al. (2010).

6.2.1 Sangue em papel filtro

Dos 58 recém-nascidos que participaram deste estudo, 56,9 % eram do sexo masculino e 43,1% do sexo feminino.

Figura 26 - Distribuição de recém-nascidos de acordo com gênero e idade. A altura das barras representa a frequência, ou seja, o número de crianças para cada gênero.



Do total, 11 foram considerados prematuros, tendo idade gestacional menor que 37 semanas e apresentaram baixo peso, sendo este menor que 2500 gramas.

Não encontramos diferença significativa entre a prematuridade dos bebês e as concentrações dos aminoácidos ($\text{Valor-}p < 0,05$). Da mesma forma, o peso não interferiu nas concentrações, conforme demonstrado pelo teste *t-student* ($\text{valor-}p$) na Tabela 9.

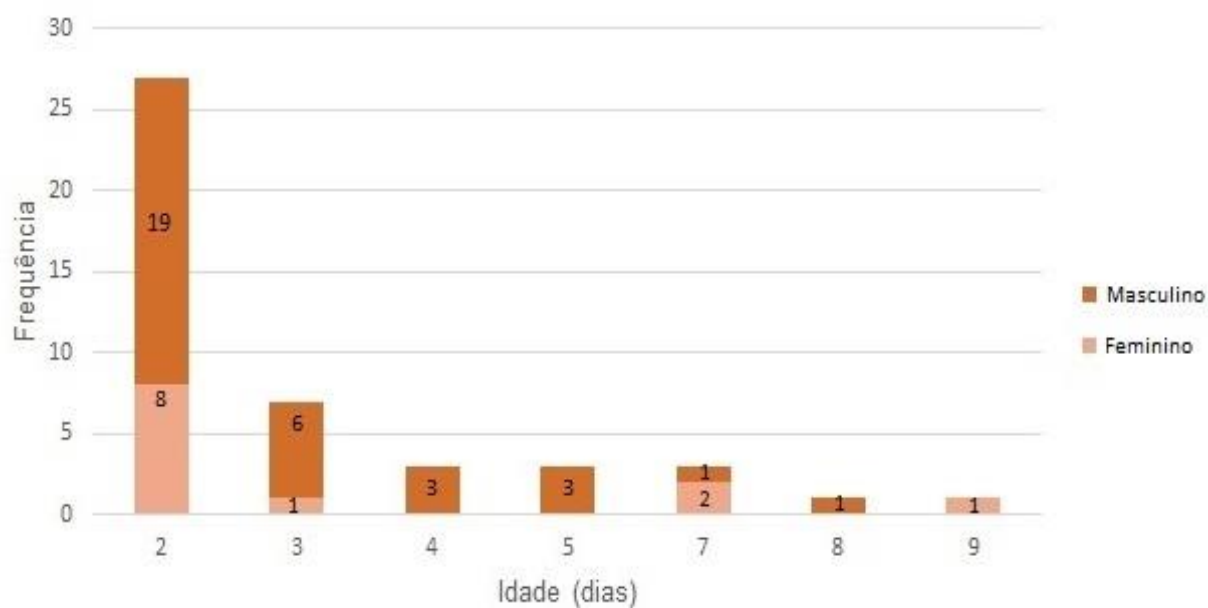
Tabela 9 - Valor-p obtido pela comparação entre as médias das concentrações dos aminoácidos encontradas no sangue em relação ao peso e prematuridade.

Aminoácido	Peso normal (n = 47)	Baixo peso (n = 11)	Peso (Valor-p)	A termo (n = 47)	Prematuro (n = 11)	Prematuridade (Valor-p)
	Média ± DP	Média ± DP		Média ± DP	Média ± DP	
Aspartato	71,3±15,4	74,7±14,8	0,53	70,4±15,7	78,3±11,4	0,12
Serina	114,3±44,8	109,0±49,0	0,73	118,1±44,9	92,8±42,5	0,10
Glutamato	192,7±51,6	192,2±90,6	0,98	198,5±62,0	167,1±43,2	0,12
Glicina	143,3±49,0	137,1±42,6	0,70	148,8±47,8	113,4±35,5	0,06
Histidina	233,4±61,5	254,3±105,5	0,39	241,4±75,0	220,2±51,6	0,38
Arginina	85,2±38,3	79,5±28,7	0,64	82,1±32,7	92,8±51,0	0,39
Treonina	69,5±26,9	76,5±33,7	0,48	73,4±28,4	59,5±24,4	0,14
Alanina	103,8±41,3	93,5±44,9	0,47	104,0±41,5	92,7±43,5	0,42
Prolina	84,8±27,9	68,5±28,5	0,09	83,6±27,8	72,0±31,2	0,25
Cisteína	27,4±11,5	22,2±6,2	0,16	26,5±11,3	26,0±9,5	0,89
Tirosina	59,5±21,3	47,5±26,4	0,12	57,0±22,6	58,3±23,8	0,86
Valina	76,0±20,1	63,1±21,6	0,06	75,7±20,6	64,6±20,1	0,11
Metionina	68,3±24,9	65,7±18,5	0,74	67,7±24,3	68,2±21,9	0,95
Lisina	49,6±16,1	42,0±15,2	0,18	49,3±16,8	43,4±12,0	0,29
Isoleucina	35,8±14,5	31,2±14,8	0,37	34,7±15,1	36,2±12,6	0,77
Leucina	61,3±18,2	49,8±18,1	0,06	60,7±18,7	52,1±17,4	0,17
Fenilalanina	39,2±16,7	36,0±28,0	0,63	38,6±17,5	38,6±25,9	0,99

6.2.2 Urina em papel filtro

Dos 45 recém-nascidos que participaram deste estudo, 71,1% eram do sexo masculino e 28,9% sexo feminino.

Figura 27 - Distribuição de recém-nascidos de acordo com gênero e idade. A altura das barras representa a frequência, ou seja, o número de crianças para cada gênero.



Do total, 7 são prematuros, tendo idade gestacional menor que 37 semanas e 13 apresentaram baixo peso, sendo menor que 2500 gramas.

Não encontramos diferença significativa entre o peso dos bebês e as concentrações dos aminoácidos (Valor- $p < 0,05$). No entanto, com relação à prematuridade, houve diferença significativa para dois aminoácidos, prolina e cistina, conforme demonstrado pelo teste *t-student* (valor- p) na Tabela 10.

Tabela 10 - Valor-p obtido pela comparação entre as concentrações dos aminoácidos encontradas na urina em relação ao peso e prematuridade.

Aminoácido	Peso normal (n = 32)	Baixo peso (n = 13)	Peso	A termo (n = 38)	Prematuro (n = 7)	Prematuridade
	Média ± DP	Média ± DP	(Valor-p)	Média ± DP	Média ± DP	(Valor-p)
Aspartato	73,9±81,1	11,8±10,4	0,24	65,4±78,8	14,5±13,2	0,41
Serina	381,5±366,6	317,8±235,5	0,57	363,4±344,9	358,4±274,7	0,97
Glutamato	149,8±155,8	143,4±216,8	0,91	131,9±147,6	234,8±273,3	0,15
Glicina	1301,1±1055,2	1663,3±1073,5	0,33	1304,2±1082,5	2007,2±720,0	0,14
Histidina	356,6±235,4	387,5±205,6	0,68	355,1±230,6	422,1±200,0	0,48
Arginina	525,4±436,0	552,0±567,2	0,87	492,4±418,1	754,2±693,5	0,18
Treonina	178,6±163,7	145,6±140,3	0,56	176,5±155,6	136,6±168,0	0,55
Alanina	211,7±213,3	211,1±236,1	0,99	205,9±202,8	233,2±284,1	0,77
Prolina	158,3±153,2	228,6±166,2	0,19	157,2±148,5	284,6±175,4	0,05
Cistina	65,8±51,1	78,6±88,9	0,55	59,3±46,4	125,1±109,4	0,01
Tirosina	128,8±116,7	118,4±109,5	0,79	133,2±121,0	85,5±44,6	0,31
Valina	131,8±96,1	116,9±97,4	0,64	125,2±91,8	140,0±121,8	0,71
Metionina	57,6±60,0	62,9±63,7	0,80	63,8±64,7	33,9±8,7	0,23
Lisina	149,0±202,3	97,1±91,7	0,44	132,3±186,0	148,6±163,5	0,83
Isoleucina	65,6±73,8	57,4±68,4	0,73	67,7±74,4	39,4±51,5	0,34
Leucina	96,3±98,6	75,3±82,4	0,50	92,0±94,2	80,5±97,9	0,77
Fenilalanina	94,0±111,3	94,0±109,9	1,00	101,4±116,7	53,8±45,1	0,30

Segundo a literatura, essa diferença pode ocorrer devido à prematuridade do sistema de reabsorção tubular dos recém-nascidos, pois a maturação deste pode influenciar principalmente a excreção de prolina, cistina e glicina na urina durante o primeiro ano de vida (BREMER, 1981; CARRAGHER, CHAMPION, 2014).

Para minimizar essa interferência, para a avaliação da excreção dos aminoácidos, deve-se escolher um parâmetro para comparação ou um composto de referência, como a quantidade de urina excretada em 24 horas ou a relação dos compostos com a creatinina.

Não houve evidência de diferenças de gênero com relação à concentração dos aminoácidos, tanto em sangue quanto em urina. Isso é consistente com outros estudos que mostraram que as diferenças de gênero começam a ser evidentes apenas após alteração nos hábitos alimentares das crianças e hormônios na adolescência (KAND'ÁR, 2009; GITAKA, 2017).

Há vários métodos de quantificação de aminoácidos descritos em literatura, no entanto, poucos trabalhos identificam simultaneamente os 17 aminoácidos utilizando a coleta de amostras de sangue e urina em papel filtro. Alguns citam as análises de sangue em papel filtro apenas para alguns aminoácidos, como fenilalanina e tirosina (KAND'ÁR, 2009), metionina, homocisteína e cisteína (WADA, 2014) ou aloisoleucina e fenilalanina (JEONG, 2001). Amostra de urina com coleta em papel filtro foi citada para acidemias orgânicas (FU, 2000) e no trabalho de Civallero et al (2013), para mucopolissacaridoses.

No Brasil, a análise quantitativa dos aminoácidos por HPLC ainda não é realizada em material coletado em papel-filtro, apenas em soro ou plasma e urina, em temperatura de geladeira. A análise de aminoácidos em sangue e urina coletados em papel-filtro minimizam os efeitos de possíveis interferentes e facilitam muito o transporte, que pode ser feito em envelope de carta.

6.2.3 Valores de referência

A adaptação fisiológica dos níveis de aminoácidos durante as primeiras semanas de vida é influenciada pela maturidade dos recém-nascidos, pelo estado nutricional e de desenvolvimento que se encontram, por hormônios, duração do jejum e pela quantidade de administração de proteína após o nascimento (BREMER, 1981; SUTTON, GRAHAM, 2015). De acordo com Shih (2003) e Ozarda (2016), a quantificação de aminoácidos pode demonstrar variações entre laboratórios, mesmo quando as metodologias utilizadas são similares.

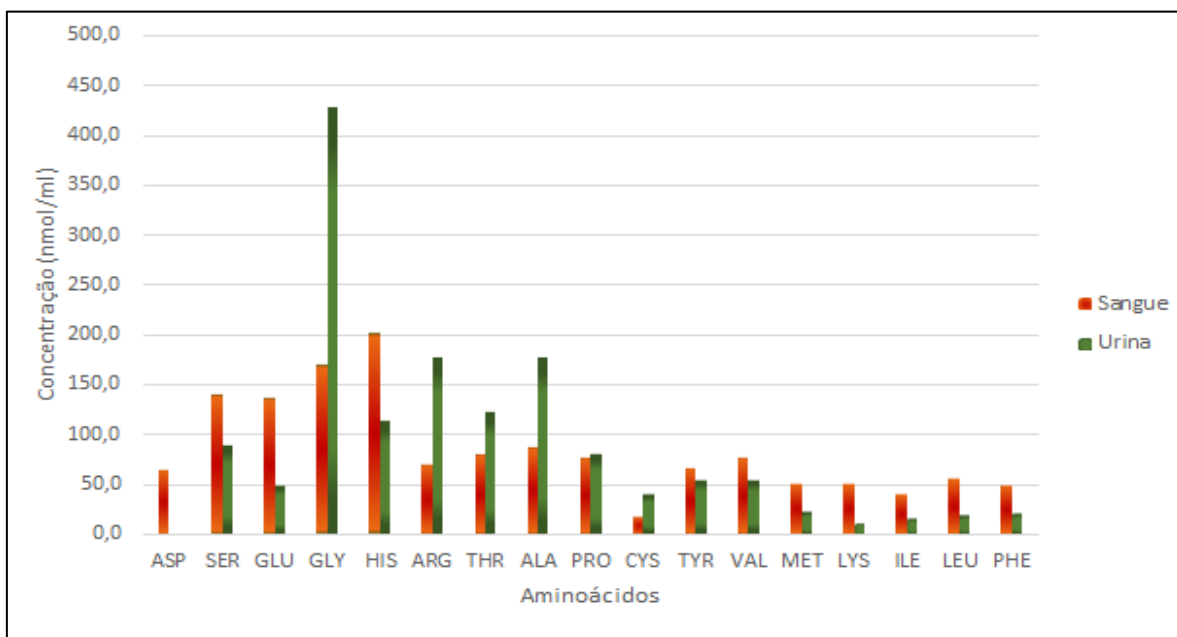
Estabelecer o próprio valor de referência para cada laboratório é o mais indicado (MCPHERSON, PINCUS, 2017; CRUZ, 2016). A correta padronização dos valores de referência é extremamente necessária para otimizar o uso em laboratórios de rotina e evitar o diagnóstico incorreto (SIEST, 2013; OZARDA, 2016). Após analisar as amostras de sangue e urina colhidas em papel filtro dos participantes deste estudo, os valores de referência padronizados estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores de referência dos aminoácidos para amostras de sangue e urina de recém-nascidos coletados em papel filtro.

Aminoácido	Sangue papel filtro	Urina papel filtro
	nmol/mL	nmol/mg creatinina
Aspartato	41,6 - 102,3	0 - 200,9
Serina	41,0 - 209,1	22,3 - 1026,3
Glutamato	72,8 - 312,3	8,7 - 493,9
Glicina	47,2 - 245,3	89,5 - 3527,6
Histidina	95,0 - 380,0	81,9 - 816,2
Arginina	21,3 - 178,7	35,4 - 1475,0
Treonina	15,1 - 138,5	16,0 - 482,0
Alanina	19,1 - 198,3	0 - 646,1
Prolina	31,9 - 151,8	9,8 - 579,0
Cistina	10,0 - 52,1	8,7 - 196,4
Tirosina	18,3 - 126,2	20,7 - 352,9
Valina	30,0 - 126,2	36,5 - 377,1
Metionina	20,5 - 142,3	19,6 - 180,0
Lisina	20,0 - 94,0	0 - 495,5
Isoleucina	8,3 - 64,1	6,0 - 210,0
Leucina	22,0 - 105,8	9,9 - 319,0
Fenilalanina	7,2 - 82,2	18,0 - 344,0

Em geral, as concentrações dos aminoácidos em sangue e em urina de um mesmo paciente, colhidos em papel filtro e no mesmo dia, não são muito discrepantes, com exceção da glicina, como mostra a Figura 28.

Figura 28 - Comparação das concentrações dos aminoácidos em amostra de sangue e urina do mesmo paciente colhidas no mesmo dia e em papel filtro.

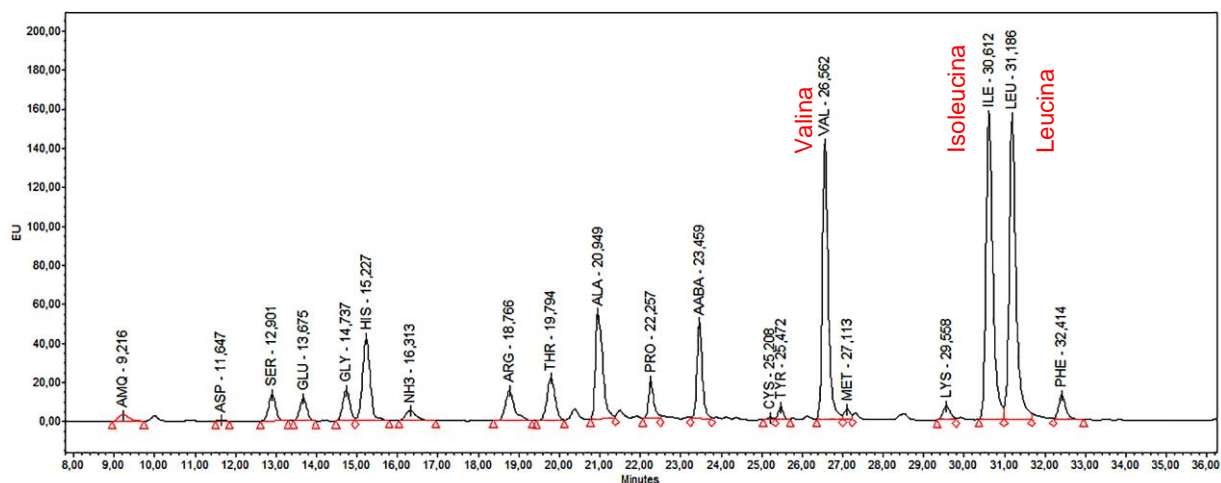


A concentração de glicina bem maior na urina quando comparada com o sangue é observada em todos os pacientes. Segundo Nyhan (2011), grandes quantidades desse aminoácido são normalmente encontradas na urina e, de acordo com Bremer (1981), a glicina é um dos principais aminoácidos detectados nessa matriz. Sua excreção depende da idade e é muito maior em recém-nascidos do que em crianças, pois a reabsorção tubular renal é menos eficiente naqueles (CARRAGHER, CHAMPION, 2014).

Held (2011), em seu estudo, quantificou aminoácidos em uma população com idades entre uma semana e 90 anos e observou que há maior excreção e maior variação nas concentrações desses analitos em recém-nascidos, refletindo a variabilidade da função tubular renal nos primeiros meses de vida. Saudubray (2016) padronizou valores de referência para plasma e urina, onde foi observada essa mesma discrepância de valores. Para recém-nascidos, a faixa de referência para glicina em plasma foi de 101 a 317 nmol/mL, enquanto para urina, foi de 160 a 2790 nmol/mg creatinina, proporção que está de acordo com o encontrado neste estudo, apesar de matrizes diferentes.

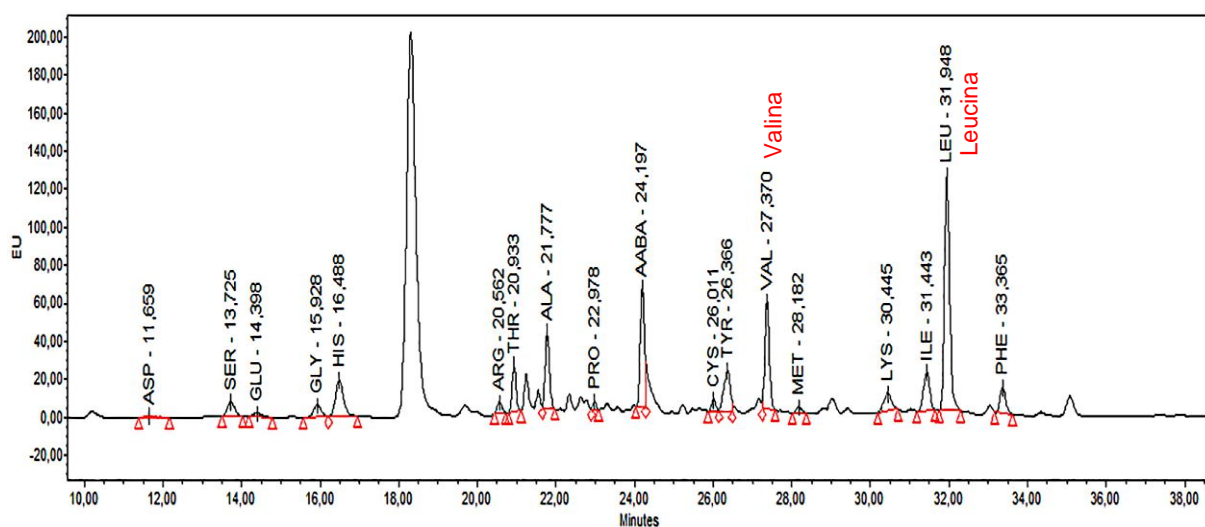
Amostras de sangue e urina de pacientes com a doença da urina do xarope de bordo foram testadas após metodologia validada, confirmando as alterações nos aminoácidos relacionados, valina, isoleucina e leucina, como demonstram as Figuras 29 e 30, cromatogramas relativos aos aminoácidos detectados em papel filtro em sangue e urina, respectivamente.

Figura 29 - Cromatograma relativo aos aminoácidos presentes em paciente com doença da urina de xarope do bordo, realizado com amostra de sangue coletada em papel filtro, onde há um aumento das concentrações de valina, isoleucina e leucina.



Legenda: ASP: ácido aspártico, SER: serina, GLU: ácido glutâmico, GLY: glicina, HIS: histidina, ARG: arginina, THR: treonina, ALA: alanina, PRO: prolina, AABA: ácido α -aminobutírico, CYS: cistina, TYR: tirosina, VAL: valina, MET: metionina, LYS: lisina, ILE: isoleucina, LEU: leucina, PHE: fenilalanina.

Figura 30 – Cromatograma relativo aos aminoácidos presentes em paciente com doença da urina de xarope do bordo, realizado com amostra de urina coletada em papel filtro, onde há um aumento das concentrações de valina e leucina.



Legenda: ASP: ácido aspártico, SER: serina, GLU: ácido glutâmico, GLY: glicina, HIS: histidina, ARG: arginina, THR: treonina, ALA: alanina, PRO: prolina, AABA: ácido α -aminobutírico, CYS: cistina, TYR: tirosina, VAL: valina, MET: metionina, LYS: lisina, ILE: isoleucina, LEU: leucina, PHE: fenilalanina.

Não foram encontrados na literatura valores de referência para todos os aminoácidos quantificados neste estudo com coleta de sangue e urina em papel filtro.

No trabalho desenvolvido por Yamaguchi (1997), o qual está sendo base para o presente estudo, o autor optou por trabalhar com valores de referência definidos por pontos de corte flutuantes, calculando a média das amostras do dia.

O aspartato ocorre em pequenas concentrações em todos os fluidos biológicos, mas possui níveis intracelulares extremamente elevados e, assim, tende a aumentar em análises de sangue total ou no plasma após hemólise (BREMER, 1981; BLAU, et al, 2008), o que está de acordo com o encontrado neste trabalho, pois a faixa de referência em plasma, segundo Saudubray (2016), é de 1 a 21 nmol/mL, bem menor do que a estabelecida para sangue total em papel filtro neste estudo. O mesmo acontece com o glutamato, onde o valor de referência em plasma é de 32 a 104 nmol/mL (SAUDUBRAY, BAUMGARTNER, WALTER, 2016).

Velden (2013) desenvolveu um estudo sobre as diferenças entre dosagens de acilcarnitinas no plasma e no sangue seco em papel filtro (DBS). Para alguns compostos, ele encontrou concentrações 36% mais elevadas em plasma, quando comparadas com o DBS e, em outros casos, o contrário foi observado. Ele relata que isso pode ser explicado pela diferença dos analitos em plasma e no sangue total coletado em papel filtro. Bremer (1981) cita algumas dessas diferenças. Além das já descritas acima para aspartato e glutamato, serina também possui concentrações significativamente maiores em eritrócitos do que em plasma; já cistina, metionina e arginina possuem menores concentrações quando comparadas.

Pecce (2013) também relata que as concentrações de analitos entre matrizes diferentes, como o soro e o sangue em papel filtro, possuem variações e só podem ser comparadas se for utilizado um fator de correção calculado por meio do hematócrito, pois se sabe que este influencia as amostras coletadas em papel filtro, pela presença dos eritrócitos (DELLA DONA, et al., 2013). Uribe (2015) estudou a influência do hematócrito em análises de sangue em papel filtro e concluiu que há

diferenças significativas de concentrações, podendo variar de acordo com a densidade/viscosidade.

Além disso, a concentração de aminoácidos nos fluidos biológicos em recém-nascidos de mães mal nutridas, com pouca ingestão de proteínas ou com insuficiência plascentária, pode ser diretamente afetada, levando à diminuição dos níveis plasmáticos dos aminoácidos essenciais (cadeia ramificada, fenilalanina, tirosina, lisina) e a um aumento concomitante de glicina, serina e prolina (BREMÉR, 1981; BLAU, et al, 2008).

É ressaltada, portanto, a importância de cada laboratório desenvolver seu próprio valor de referência, de acordo com a matriz utilizada e a população estudada (idade, alimentação, entre outros).

Em nosso estudo, apenas 10 μ L das amostras são utilizadas para análise e o resultado preciso foi indicado em quase todos os participantes. No entanto, em cinco pacientes, os valores de alguns aminoácidos não foram detectados, tanto no sangue quanto em urina. Isso pode ser devido a algum erro de coleta ou na preparação/derivatização da amostra, pois o volume pipetado, tanto dos reagentes quanto das amostras, é bem pequeno, sendo necessário, nestes casos, repetir a coleta ou o processo de derivatização da mesma. Situação semelhante é relatada por Graser, et al (1985), onde o autor afirma que isso pode acontecer por preparação imprópria das amostras, além de citar que extrações podem ser incompletas quando utilizados metanol ou acetonitrila. Fu, et al. (2000), também relata o mesmo e acredita que se houvesse um maior volume de amostra disponível, no caso, um papel filtro maior para coleta de urina, a precisão do diagnóstico poderia ser aperfeiçoado.

Com relação ao aspartato em urina, apenas 11 das 45 amostras de recém-nascidos foram quantificadas. Isso pode ser explicado pela sua baixa excreção em urina ou que a hidrólise (derivatização) não tenha sido totalmente eficaz para esse analito, pois, de acordo com Blau (2008), a maioria dos agentes derivatizantes utilizados na preparação das amostras não reage quantitativamente da mesma forma com todos os aminoácidos. Segundo Matsuki (1975), estima-se que cerca de dois terços do aspartato estão presentes na urina em forma de peptídeos ou aminoácidos ligados, seja como asparagina ou como di ou tri-peptídeos. Para que este analito seja totalmente detectado, é necessário sofrer uma hidrólise anterior à análise e demonstra, em seu trabalho, a composição da urina humana antes e depois da hidrólise, sendo de 0,0 mg/dia e de $156,1 \pm 26,7$ mg/dia, respectivamente (MATSUKI, 1975; BREMER, 1981, BLAU, DURAN, GIBSON, 2008).

Held (2011) afirma em seu trabalho que em pacientes normais, a excreção de alguns aminoácidos em urina é mínima e, de acordo com Blau (2008), o aspartato ocorre em pequenas concentrações em todos os fluidos biológicos, mas tem níveis intracelulares extremamente elevados, podendo aumentar no plasma após hemólise. Talvez por essa facilidade de ser dosado em sangue e pelos motivos citados acima, seja raro encontrar na literatura a quantificação deste aminoácido em urina.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho descreveu um método simples, rápido e eficaz para análise simultânea de 17 aminoácidos em sangue e urina coletados em papel filtro em uma única corrida. O método validado demonstrou boa resolução, precisão e repetibilidade para todos os aminoácidos analisados, além de ser sensível o suficiente para quantificá-los. Foi identificado o efeito de matriz para todos os aminoácidos. A análise quantitativa requer um volume pequeno de amostra e apresenta boa estabilidade dos aminoácidos derivatizados.

Os valores de referência para sangue e urina coletados em papel filtro foram estabelecidos e validados. Não há um consenso com relação à matriz a ser utilizada que melhor reflita a concentração dos analitos de interesse, se plasma, sangue seco em papel filtro, urina ou urina em papel filtro, mas está comprovado que a coleta realizada em papel filtro oferece um número bem maior de vantagens, dentre elas, a facilidade de transporte e do diagnóstico rápido de várias doenças, inclusive dos erros inatos do metabolismo.

O estudo realizado é de grande importância para a detecção dos erros inatos do metabolismo, pois a população terá os benefícios do diagnóstico e tratamento precoces, evitando sintomas e sequelas nos recém-nascidos. Esse método pode ser utilizado em laboratórios de rotina e é uma ferramenta ideal para a área pediátrica, onde obter um grande volume de amostra nem sempre é possível.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, G.K.S. Desenvolvimento e validação de metodologia para análise simultânea de aminoácidos como possíveis marcadores neurobiológicos da esquizofrenia utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2012

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

ARAÚJO, W.A.G., ASSIS, F.I.J., SOBREIRA, G.F. Fundamentos e métodos para análise de aminoácidos. *Revista Eletrônica Nutritime*, v.4, pg 395-404, 2007.

BABU, S.V.S., SHAREEF, M.M., SHETTY, A.P.K., SHETTY, K.T. HPLC method for amino acids profile in biological fluids and inborn metabolic disorders of aminoacidopathies. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2002; 17: 7-26.

BEHRMAN, R.E., KLIEGMAN, R.M., JENSON, H.B. *Tratado de Pediatria*. 16ª edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2002.

BLAU, N. PKU and BH4 – Advances in phenylketonuria and tetrahydrobiopterin. Switzerland, 1ª ed., 2006.

BLAU, N.; DURAN, M.; GIBSON, K.M. *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. German, 2008.

BREIER, A.C. Análises bioquímicas em amostras de urina e sangue colhidas em papel filtro: uma alternativa para Mucopolissacaridoses I e VI. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

BREMER, H.J.; DURAN, M.; KARMERLING, J.P.; PRZYREMBEL, H.; WADMAN, S.K. *Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis*. Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich, 1981.

BURTIS, C.A., BRUNS, D.E. *Tietz Fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Elsevier, Saunders, 7 ed. 2015.

CAMARGO, SPS. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de canabidiol e tetraidroanabinol em amostras de plasma por

cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas. Universidade de São Paulo. 2008.

CARRAGHER, F., CHAMPION, M. Inherited metabolic disease. In *Clinical Biochemistry - Metabolic and Clinical Aspects*, 3^a ed., 2014.

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.

CHAKRAPANI A, GISSEN P, MCKIERNAN. Disorders of tyrosine metabolism. In: Saudubray, *Inborn metabolic diseases*, 5th ed, 2012: 265-276.

CHEN, P.W., LEE, N.C., CHIEN, Y.H., WU, J.Y., WANG, P.C., HWU, W.L. Diagnosis of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency by measuring 3-O-methyl dopa concentrations in dried blood spots. *Clinica Chimica Acta*. 2014; 431: 19-22.

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*. 8^a ed. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 1971 – 1995.

CIVALLERO, G., BENDER, F., GOMES, A., MARASCA, G., GUIDOBONO, R., MARI, J., Reliable detection of mucopolysacchariduria in dried-urine paper samples. *Clin Chim Acta*, 2013; 415: 334-6.

CLARKE, J.T.R., *Inherited Metabolic Diseases*. 3^a ed. Cambridge University Press, New York; 2005.

COHEN, S.A., MICHAUD, D.P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem*. 1993; 279: 279-287.

CONTRERAS, J.; ALONSO, E.; FUENTES, L.E. HPLC for Confirmatory Diagnosis and Biochemical Monitoring of Cuban Patients with Hyperphenylalaninemias. *MEDICC Review*, January 2015, Vol. 17, N^o 1.

COX, M.M., NELSON, D.L. *Lehninger - Principles of Biochemistry*. 6^a ed. New York, 2013.

CRUZ, A.F.; BARBOSA, T.M.C.C.; ADELINO, T.E.R.; LIMA, W.P.; MENDES, M.O.; VALADARES, E.R. Valores de referência de aminoácidos por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de plasma de crianças brasileiras. *J. Bras Med Lab*, v 52, n 2, pg. 70-77, Abril, 2016.

DALE, Y.; MACKEY, V.; MUSHI, R.; NYANDA, A.; MALEQUE, M.; IKE, J. Simultaneous measurement of phenylalanine and tyrosine in phenylketonuric plasma and dried blood by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v 778, p. 1-8; 2003.

DELLA BONA, M.L., MALVAGIA, S., VILLANELLI, F., GIOCALIERE, E., OMBRONE, D., FUNGHINI, S., FILIPPI, L., CAVALLARO, G., BAGNOLI, P., GUERRINI, R. A rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry-based method for measuring propranolol on dried blood spots. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013; Vol. 78–79, pg. 34–38.

DEMIREV, P.A. Dried blood spots: analysis and applications. *Anal Chem*, 2013; 85: 779-789.

DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Inmetro. Revisão 4, 2011.

EL HATTAB, A.W. Inborn errors of metabolism. *Clin Perinatol*, v 42, p. 413-439, 2015.

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

FEBRIANI A.D., SAKAMOTO, A., ONO, H., SAKURA, N., UEDA, K., YOSHII, C., KUBOTA, M., YANAGAWA, J. Determination of total homocysteine in dried blood spots using high performance liquid chromatography for homocystinuria newborn screening. *Pediatr Int.*, v 46, p. 5-9; 2004.

FEEKS, D. State of the art of high performance liquid chromatography analysis of amino acids in physiological samples. *J. Chromat. B*. 1996; 682(1): 3-22.

Food and Drug Administration (FDA) - Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Department of Health & Human Services, 2013.

Food and Drug Administration (FDA) - Guidance for Industry. Desenvolvimento e validação de uma técnica analítica para a quantificação de lamotrigina em plasma humano. Capítulo 2: pg 81-82, 2009.

FU, X.W., IGA, M., KIMURA, M., YAMAGUCHI, S. Simplified screening for organic acidemia using GC/MS and dried urine paper filter: a study on neonatal screening. *Early Human Development*. 2000; 58: 41-55.

GHORABA, D.A., MOHAMED, M.M., ZAKI, O.K. Screening of diseases associated with abnormal metabolites for evaluation of HPLC in organic aciduria profiling. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2014; 15: 69-78.

GITAKA, J., OGWANG, C., NGARI, M., J., Akoo, P., Olotu, A., kerubo, C. Clinical laboratory reference values amongst children aged 4 weeks to 17 months in Kilifi, Kenya: A cross sectional observational study. Sanjai Kumar, 2017.

GIUGLIANI, R., VAIRO, F. P., RIEGEL, M., SOUZA, C. F. M., SCHWARTZ, I. V. D. Rare disease landscape in Brazil: report of a successful experience in inborn errors of metabolism. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2016.

GRASER, T.A., GODEL, H.G., ALBERS, S., FOLDI, P., FURST, P. An ultra rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids. *Analytical Biochemistry*, 1985; 151: 142-152.

HARIHARAN, M., NAGA, S., VANNOORD, T. Systematic approach to the development of plasma amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection with precolumn derivatization using phenyl isothiocyanate. *Journal of Chromatography*, 1993; 621: 15-22.

HELD, P.K., WHITE, L., PASQUALI, M. Quantitative urine amino acid analysis using liquid chromatography tandem Mass spectrometry and aTRAQ® reagents. *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 2695– 2703.

HOFFMANN, G.F.; ZSCHOCKE, J.; NYHAN, W.L. *Inherited Metabolic Diseases: A clinical Approach*. 2^o edition, Alemanha, 2016.

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.

JEONG, J.S., SIM, H.J., LEE, Y.M., YOON, H.R., KWON, H.J., HONG, S.P. Chromatographic diagnosis of maple syrup urine disease by measuring the L-alloisoleucine/L-phenilalanine ratio in dried blood spots. *Journal of Chromatography*. 2011; 879: 2171-2174.

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

KAND'AR, R., et al. Determination of phenylalanine and tyrosine in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic, 2009.

KARAM, P.E., HABBAL, M.Z., MIKATI, M.A., ZAATARI, G.E., CORTAS, N.K., DAHER, R.T. Diagnostic challenges of aminoacidopathies and organic acidemias in a developing country: a twelve-year experience. *Clinical Biochemistry*, 46, 1787-1792; 2013.

KARAM, S.M.. SCHWARTZ, I.V.D., GIUGLIANI, R. Erros Inatos do Metabolismo. In CARAKUSHANSKY, G. *Doenças Genéticas em Pediatria*. 1^a ed., Rio de Janeiro, 2001.

LEVY, H. Histidinemia. In: Orphanet; 2004. Disponível em: http://www.orpha.net/consor/cgi-Group=histidinemia&Disease_Histidinemia_Simple> Acesso em 10 de junho de 2017.

LUNDANES, E., REUBSAET, L., GREIBROKK, T. *Chromatography – Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*, Weinheim, Germany. 2013

MAEDA, N., SATO, M., HAENO, S., YOKOTA, H. Simultaneous determination of the neurotransmitters and free amino acids in rat organs by LC-MS analysis. *Science Journal of Graduate School of Rakuno Gakuen University, Japan*; 2016.

MAK, CM., LEE, H.C., CHAN, A.Y. LAM, C.W. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2013; 50:142-162.

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

MATSUKI, H., YOSHIO, Y., NISHI, H. Forms of Aspartic Acid in Human Urine. *Agr. Bioi. Chem.*, 1976; 40: 851-858.

MCPHERSON, R.M., PINCUS, M.R. Henry's clinical diagnosis and management. St. Louis, Missouri : Elsevier, 23 ed. 2017

MORTON, D.H., STRAUSS, A.K., ROBINSON, D.L., PUFFENBERGER, E.G., KELLEY, R.I. Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics*. 2002; 109: 999-1008.

NADAI, C.P., ARAUJO, A.A., TRINDADE, K.M., PINHEIRO, P.R.E., COUTINHO, H.D.M. Aminoacidopatias: características clínicas e genéticas. *Revista Brasileira de Medicina*, 2006.

NESTEROVA, G., GAHL, W.A. Cystinosis. In: GeneReviews®. University of Washington, Seattle; 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1400>>. Acesso em 10 de junho de 2017.

NYHAN, W.L., BARSHOP, B.A., AL-AQEEL, A.I. Atlas of Inherited Metabolic diseases. 3ª ed. Flórida. Hodder Arnold, 2011.

OZARDA, Y. Reference Intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochemica Medica*, 26, 5-16; 2016.

PECCE, R., et al. Optimization of an HPLC method for phenylalanine and tyrosine quantization in dried blood spot. *Clinical Biochemistry*. 2013; 46: 1892-1895.

POLLITT, R.J. Robert Guthrie. *J. Inher. Metab. Dis*, pg. 533; 1995.

Portaria GM/MS nº 22, de 15 de janeiro de 1992.

RODRIGUES, C.E. Análise e Separação de Aminoácidos Naturais e Não-naturais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Laboratório de Métodos

Biofísicos de Análise. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

RODRIGUES, M.D., OLIVEIRA, A.C., MULLER, K.B., MARTINS, A.M., D'ALMEIDA, V. Chitotriosidase determination in plasma and in dried blood spots: a comparison using two different substrates in a microplate assay. *Clin Chim Acta*, 2009; 406: 86-88.

SALWAY, J.G. *Metabolismo Passo a Passo*. Artmed, 3ª ed. Porto Alegre, 2009.

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.

SAUDUBRAY, J.M., BAUMGARTNER, M.R., WALTER, J.; *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment*. 6ª ed., 2016.

SCAINI, G. Avaliação de parâmetros neuroquímicos e comportamentais em um modelo animal da doença da urina do xarope do bordo. Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2014.

SCRIVER, C.R.; GREGORY, D.M.; SOVETTS, D.; TISSENBAUM, G. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 2001.

SEO, S.S. High Performance Liquid Chromatographic determination of homocysteine and cystathione in biological samples by derivatization with 6-amino-quinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC). *Journal of Korean Chemical Society*, v. 49, nº 3, 2005.

SHARMA, G.; ATTRI, S.V.; BEHRA, S.B.; KUMAR, P.; TAGEJA, M.; SHARDA, S.; SINGHI, P.; SINGHI, S. Analysis of 26 amino acids in human plasma by HPLC using AQC as derivatizing agent and its application in metabolic laboratory. Springer-Verlag, 2014.

SHAWKY, R.M., ABD-ELKHALEK, H.S., ELAKHADAR, S.E. Selective screening in neonates suspected to have inborn errors of metabolism. *The Egyptian Journal of Med. Human Genetics*. 2015; 16: 165-171.

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

SIEST, G., HENNY, J., GRASBECK, R., WILDING, P., PETITCLERC, C., PETERSEN, P.H. The theory of reference values: an unfinished symphony. Clin Chem Lab Med 2013; 51(1): 47–6.

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

SOUZA, C.N., MARTINS, A.M., D' ALMEIDA, V., SILVA, L.C.S. Triagem urinária para erros inatos do metabolismo em crianças com atraso no desenvolvimento. Revista Paraense de Medicina. V21 (2); 2007.

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.

SUTTON, V.R., GRAHAM, B.H. Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism. In: LEE, B., SCAGLIA, F. Inborn Errors of Metabolism - From neonatal screening to metabolic pathways. Oxford University Press, 2015.

THERRELL B.L., Adams, J. Newborn screening in North America. J Inherit Metab Dis, 30:447–465; 2007.

URIBE, B., ALBONIGA, O.E., GONZÁLEZ, O., ALONSO, R.M. Study of Dried Blood Spot Reliability for Quantitative Drug Analysis by UHPLC-PDA-FLUO. Sciforum Mol2Net, 2015; 1: 1-7.

VAN HOVE, J., COUGHLIN, C., SCHARER, G. Glycine Encephalopathy. In: GeneReviews®. University of Washington, Seattle; 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1357>>. Acesso em 10 de junho de 2017.

VELDEN, M.G.M.S.; DIEKMAN, E.F., JANS, J.J., HAM, M.V., PRINSEN, B.H.C.M.T., VISSER, G., VERHOEVEN-DUIF, N.M. Molecular Genetics and Metabolism, v 110, p. 116-121; 2013.

WADA, M., KUROKI, M., MINAMI, Y., IKEDA, R., SEKITANI, Y., TAKAMURA, N., KAWAKAMI, S., KURODA, N., NAKASHIMA, K. Quantitation of sulfur-containing amino acids, homocysteine, methionine and cysteine in dried blood spots from newborn baby by HPLC-fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 2014; 28: 810-814.

WEINER, M.D, DEBRA, L. Metabolic Emergencies. In FLEISHER, G.R., LUDWIG, S. *Textbook of Pediatric Emergency Medicine*. 6^a ed. Philadelphia, 2010.

WENDISCH, V.F.; STEINBUCHER, A. *Amino Acid Biosynthesis – Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*. Berlin Heidelberg, Germany; Vol 4, 2007.

YAMAGUCHI, A., TAGAMI, Y., FUKUSHI, M., ODA, H., FUJITA, K. Application of high-performance liquid chromatography with ACCQ-Tag precolumn derivatization to the screening for inborn errors of metabolism. Sapporo City Institute of Public Health. 1997.

YOKOYAMA, Y.; YAMASAKI, K.; SATO, H. Simultaneous determination of urinary creatinine and UV-absorbing amino acids using a novel low-capacity cation-exchange chromatography for the screening of inborn errors of metabolism. *Journal of Chromatography B*. 2005; 816: 333-338.

ANEXOS

Anexo I

Tabela 12 - Estudo da linearidade em papel filtro para todos os aminoácidos.

AA	Concent.	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta	AA	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta
Ácido Áspartico	100	0,011	0,001	7,398		Histidina	0,023	0,001	5,709	
	200	0,022	0,000	1,498	$y = 0,0001x + 0,0005$		0,038	0,000	0,101	$y = 0,0002x + 0,0009$
	400	0,042	0,001	1,859	$R^2 = 0,997$		0,070	0,001	1,466	$R^2 = 0,997$
	600	0,063	0,005	8,317	$y = 0,0001x - 0,0054$		0,102	0,006	6,332	$y = 0,0002x - 0,0077$
	800	0,085	0,004	4,498	$R^2 = 0,992$		0,145	0,007	4,753	$R^2 = 0,994$
	1000	0,116	0,008	6,910	$y = 0,0001x - 0,0104$		0,197	0,016	8,205	$y = 0,0002x - 0,0161$
	1250	0,121	0,007	5,899	$R^2 = 0,989$		0,207	0,008	4,063	$R^2 = 0,996$
	2500	0,279	0,033	11,941			0,474	0,059	12,376	
Ácido Glutâmico	100	0,012	0,000	1,267		Treonina	0,025	0,001	5,005	
	200	0,023	0,001	4,834	$y = 0,0001x - 0,0002$		0,045	0,001	1,865	$y = 0,0002x + 0,0035$
	400	0,045	0,001	2,663	$R^2 = 0,997$		0,085	0,002	2,460	$R^2 = 0,996$
	600	0,068	0,005	6,837	$y = 0,0001x - 0,0052$		0,127	0,010	7,885	$y = 0,0002x - 0,0079$
	800	0,093	0,005	5,283	$R^2 = 0,993$		0,170	0,009	5,090	$R^2 = 0,993$
	1000	0,127	0,009	6,860	$y = 0,0001x - 0,0119$		0,232	0,016	7,003	0,000
	1250	0,134	0,007	5,198	$R^2 = 0,997$		0,244	0,015	6,143	$R^2 = 0,997$
	2500	0,305	0,040	13,191			0,555	0,073	13,084	
Glicina	100	0,018	0,003	14,772		Alanina	0,041	0,006	14,791	
	200	0,028	0,000	0,736	$y = 0,0001x + 0,0007$		0,050	0,001	1,440	$y = 0,0002x + 0,0082$
	400	0,048	0,002	4,074	$R^2 = 0,995$		0,090	0,003	2,860	$R^2 = 0,996$
	600	0,071	0,005	6,898	$y = 0,0001x - 0,0043$		0,132	0,011	8,696	$y = 0,0003x - 0,0112$
	800	0,100	0,005	5,280	$R^2 = 0,994$		0,174	0,008	4,346	$R^2 = 0,995$
	1000	0,134	0,010	7,665	$y = 0,0002x - 0,0077$		0,236	0,016	6,760	$y = 0,0002x + 0,0012$
	1250	0,142	0,005	3,679	$R^2 = 0,997$		0,250	0,013	5,099	$R^2 = 0,987$
	2500	0,325	0,036	11,055			0,567	0,072	12,624	

Continuação Tabela 12 – Estudo da linearidade em papel filtro para todos os aminoácidos

AA	Concent.	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta	AA	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta
Prolina	100	0,008	0,001	6,673		Metionina	0,022	0,001	4,301	
	200	0,018	0,001	6,079	$y = 0,0001x - 0,0105$		0,044	0,000	0,834	$y = 0,0003x - 0,034$
	400	0,037	0,001	2,164	$R^2 = 0,997$		0,089	0,002	1,956	$R^2 = 0,996$
	600	0,056	0,004	7,578	$y = 9E-05x - 0,0007$		0,140	0,011	7,494	$y = 0,0002x - 0,0103$
	800	0,074	0,003	4,506	$R^2 = 0,996$		0,190	0,008	4,055	$R^2 = 0,995$
	1000	0,101	0,008	8,253	$y = 0,0001x - 0,0071$		0,261	0,023	8,929	$y = 0,0003x - 0,0201$
	1250	0,107	0,006	5,223	$R^2 = 0,993$		0,279	0,015	5,192	$R^2 = 0,994$
	2500	0,250	0,032	12,704			0,660	0,082	12,341	
Fenilalanina	100	0,057	0,002	3,748		Lisina	0,019	0,001	5,166	
	200	0,111	0,000	0,143	$y = 0,0007x - 0,0554$		0,033	0,000	1,330	$y = 0,0001x + 0,0051$
	400	0,213	0,006	2,743	$R^2 = 0,996$		0,057	0,002	2,757	$R^2 = 0,997$
	600	0,320	0,024	7,643	$y = 0,0005x - 0,001$		0,081	0,006	7,878	$y = 0,0002x - 0,0105$
	800	0,427	0,019	4,341	$R^2 = 0,995$		0,112	0,004	3,763	$R^2 = 0,995$
	1000	0,582	0,044	7,584	$y = 0,0006x - 0,0305$		0,155	0,011	7,133	$y = 0,0001x - 0,003$
	1250	0,622	0,039	6,319	$R^2 = 0,994$		0,160	0,008	4,877	$R^2 = 0,991$
	2500	1,433	0,175	12,182			0,363	0,047	13,034	
Tirosina	100	0,026	0,001	3,405		Isoleucina	0,040	0,002	5,459	
	200	0,051	0,001	1,697	$y = 0,0003x - 0,02$		0,086	0,001	0,646	$y = 0,0005x - 0,0463$
	400	0,094	0,005	5,143	$R^2 = 0,997$		0,163	0,009	5,383	$R^2 = 0,996$
	600	0,145	0,010	6,655	$y = 0,0002x - 0,0009$		0,241	0,019	7,839	$y = 0,0004x - 0,001$
	800	0,188	0,008	4,399	$R^2 = 0,996$		0,323	0,015	4,682	$R^2 = 0,996$
	1000	0,257	0,020	7,854	$y = 0,0002x - 0,0066$		0,441	0,035	8,030	$y = 0,0004x - 0,0278$
	1250	0,274	0,015	5,408	$R^2 = 0,997$		0,466	0,021	4,579	$R^2 = 0,993$
	2500	0,626	0,076	12,160			1,091	0,140	12,805	

Finalização Tabela 12 – Estudo da linearidade em papel filtro para todos os aminoácidos

AA	Concent.	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta	AA	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta	
Serina	100	0,020	0,003	13,249		Arginina	0,030	0,001	4,508		
	200	0,030	0,000	0,240	$y = 0,0001x - 0,0045$		0,053	0,000	0,413	$y = 0,0002x + 0,0123$	
	400	0,054	0,003	4,791	$R^2 = 0,993$		0,091	0,000	0,321	$R^2 = 0,996$	
	600	0,079	0,007	9,379	$y = 0,0001x + 0,0006$		0,131	0,009	7,147	$y = 0,0002x - 0,0012$	
	800	0,106	0,006	5,234	$R^2 = 0,992$		0,172	0,009	5,450	$R^2 = 0,992$	
	1000	0,145	0,009	6,432	$y = 0,0002x - 0,0056$		0,232	0,016	6,865	$y = 0,0002x - 0,0099$	
	1250	0,151	0,007	4,489	$R^2 = 0,997$		0,242	0,013	5,583	$R^2 = 0,989$	
	2500	0,353	0,033	9,388			0,540	0,067	12,491		
Valina	100	0,035	0,002	5,567		Leucina	0,041	0,002	3,879		
	200	0,065	0,000	0,340	$y = 0,0004x - 0,0259$		0,081	0,002	2,758	$y = 0,0005x - 0,0449$	
	400	0,124	0,002	1,943	$R^2 = 0,997$		0,155	0,003	2,242	$R^2 = 0,995$	
	600	0,183	0,015	8,153	$y = 0,0003x + 0,0043$		0,228	0,015	6,787	$y = 0,0004x - 0,0038$	
	800	0,243	0,009	3,542	$R^2 = 0,997$		0,306	0,015	4,865	$R^2 = 0,995$	
	1000	0,334	0,024	7,328	$y = 0,0003x - 0,0131$		0,420	0,031	7,447	$y = 0,0004x - 0,0261$	
	1250	0,352	0,019	5,311	$R^2 = 0,994$		0,446	0,023	5,221	$R^2 = 0,992$	
	2500	0,804	0,100	12,449			1,048	0,136	12,966		
Cistina	50	0,003	0,000	6,299							
	100	0,005	0,000	2,131	$y = 5E-05x - 0,0008$						
	200	0,010	0,000	1,098	$R^2 = 0,996$						
	300	0,015	0,001	5,602	$y = 6E-05x - 0,0022$						
	400	0,020	0,001	5,392	$R^2 = 0,993$						
	500	0,030	0,002	7,310	$y = 5E-05x - 0,0007$						
	625	0,030	0,003	11,469	$R^2 = 0,986$						
	1250	0,068	0,007	9,566							

Anexo II

Tabela 133 - Estudo da linearidade em solução salina 0,9% (m/v) para todos os aminoácidos

AA	Concent.	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta	AA	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta
Ácido Áspartico	100	0,239	0,004	1,613		Histidina	0,437	0,006	1,340	
	200	0,485	0,006	1,133	$y = 0,0023x + 0,0039$		0,884	0,003	0,339	$y = 0,0044x - 0,0233$
	400	0,921	0,011	1,191	$R^2 = 0,997$		1,708	0,014	0,835	$R^2 = 0,999$
	600	1,423	0,053	3,749	$y = 0,002x + 0,1522$		2,628	0,039	1,495	$y = 0,0045x - 0,1351$
	800	1,815	0,036	1,985	$R^2 = 0,994$		3,309	0,046	1,376	$R^2 = 0,999$
	1000	2,301	0,040	1,758	$y = 0,0016x + 0,327$		4,366	0,058	1,332	$y = 0,0051x - 0,427$
	1250	2,912	0,009	0,319	$R^2 = 0,971$		5,445	0,040	0,730	$R^2 = 0,991$
	2500	4,409	0,248	5,628			11,549	1,004	8,690	
Serina	100	0,309	0,008	2,505		Treonina	0,487	0,004	0,852	
	200	0,614	0,002	0,290	$y = 0,003x + 0,0137$		0,986	0,007	0,676	$y = 0,0048x + 0,0063$
	400	1,184	0,012	0,979	$R^2 = 0,999$		1,882	0,025	1,325	$R^2 = 0,999$
	600	2,004	0,015	0,740	$y = 0,0032x - 0,0657$		2,961	0,029	0,986	$y = 0,005x - 0,1218$
	800	2,340	0,021	0,916	$R^2 = 0,998$		3,714	0,058	1,558	$R^2 = 0,998$
	1000	3,033	0,028	0,921	$y = 0,0028x + 0,1484$		4,744	0,084	1,778	$y = 0,0044x + 0,1732$
	1250	3,799	0,039	1,032	$R^2 = 0,996$		5,851	0,018	0,305	$R^2 = 0,999$
	2500	7,344	0,263	3,583			11,643	0,696	5,977	
Glicina	100	0,282	0,004	1,289		Alanina	0,505	0,001	0,138	
	200	0,569	0,004	0,669	$y = 0,0028x + 0,001$		1,030	0,011	1,114	$y = 0,0048x + 0,0916$
	400	1,084	0,008	0,698	$R^2 = 0,999$		1,973	0,010	0,491	$R^2 = 0,999$
	600	1,752	0,053	3,037	$y = 0,0028x + 0,0084$		3,113	0,037	1,200	$y = 0,0047x + 0,1816$
	800	2,138	0,062	2,907	$R^2 = 0,999$		3,898	0,086	2,216	$R^2 = 0,999$
	1000	2,753	0,032	1,169	$y = 0,0032x - 0,2001$		4,923	0,079	1,599	$y = 0,0039x + 0,5169$
	1250	3,470	0,028	0,800	$R^2 = 0,994$		6,153	0,055	0,900	$R^2 = 0,986$
	2500	7,200	0,549	7,624			10,849	0,241	2,218	

Continuação Tabela 13 – Estudo da linearidade em solução salina 0,9% (m/v) para todos os aminoácidos.

AA	Concent.	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta	AA	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta
Arginina	100	0,440	0,004	0,797		Tirosina	0,460	0,005	1,047	
	200	0,899	0,004	0,492	$y = 0,0044x - 0,0365$		0,961	0,006	0,649	$y = 0,0047x - 0,0404$
	400	1,727	0,026	1,505	$R^2 = 0,999$		1,850	0,012	0,625	$R^2 = 0,999$
	600	2,671	0,065	2,438	$y = 0,0043x + 0,0219$		2,887	0,181	6,270	$y = 0,0048x - 0,1415$
	800	3,392	0,068	2,004	$R^2 = 0,999$		3,589	0,116	3,232	$R^2 = 0,999$
	1000	4,383	0,094	2,146	$y = 0,0048x - 0,2376$		4,616	0,051	1,107	$y = 0,0055x - 0,4727$
	1250	5,439	0,030	0,555	$R^2 = 0,996$		5,773	0,043	0,751	$R^2 = 0,989$
	2500	11,058	0,663	5,997			12,338	0,105	0,854	
Ácido Glutâmico	100	0,268	0,003	0,999		Valina	0,734	0,006	0,850	
	200	0,039	0,005	12,736	$y = 0,0026x - 0,0042$		1,525	0,012	0,809	$y = 0,0075x - 0,025$
	400	1,042	0,004	0,368	$R^2 = 0,997$		2,960	0,033	1,104	$R^2 = 0,999$
	600	1,584	0,057	3,612	$y = 0,0024x + 0,1394$		4,562	0,113	2,481	$y = 0,0078x - 0,2241$
	800	2,035	0,062	3,044	$R^2 = 0,995$		5,792	0,049	0,853	$R^2 = 0,998$
	1000	2,629	0,017	0,660	$y = 0,0019x + 0,2698$		7,420	0,070	0,943	$y = 0,0067x + 0,3584$
	1250	3,324	0,025	0,758	$R^2 = 0,990$		9,316	0,105	1,123	$R^2 = 0,997$
	2500	5,215	0,513	9,834			17,827	0,593	3,329	
Prolina	100	0,218	0,002	1,080		Metionina	0,604	0,005	0,832	
	200	0,456	0,005	1,016	$y = 0,0023x - 0,0361$		1,271	0,024	1,911	$y = 0,0062x - 0,0223$
	400	0,899	0,008	0,933	$R^2 = 0,999$		2,501	0,031	1,232	$R^2 = 0,999$
	600	1,373	0,033	2,371	$y = 0,0021x + 0,0896$		3,844	0,137	3,557	$y = 0,0066x - 0,1399$
	800	1,774	0,019	1,053	$R^2 = 0,997$		4,907	0,056	1,131	$R^2 = 0,999$
	1000	2,280	0,030	1,299	$y = 0,0025x - 0,1375$		6,287	0,070	1,107	$y = 0,0073x - 0,5476$
	1250	2,823	0,008	0,278	$R^2 = 0,996$		7,883	0,060	0,755	$R^2 = 0,993$
	2500	5,569	0,447	8,032			16,312	0,632	3,877	

Finalização Tabela 13 – Estudo da linearidade em solução salina 0,9% (m/v) para todos os aminoácidos.

AA	Concent.	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta	AA	Valor médio	DP	CV (%)	Equação da reta	
Lisina	100	0,357	0,004	1,152		Leucina	0,921	0,006	0,644		
	200	0,715	0,013	1,855	$y = 0,0032x + 0,1144$		1,939	0,047	2,421	$y = 0,0099x - 0,0884$	
	400	1,381	0,007	0,516	$R^2 = 0,997$		3,865	0,048	1,244	$R^2 = 0,999$	
	600	2,014	0,120	5,963	$y = 0,0031x + 0,1653$		5,887	0,085	1,447	$y = 0,009x + 0,3079$	
	800	2,622	0,190	7,235	$R^2 = 0,991$		7,609	0,229	3,013	$R^2 = 0,998$	
	1000	3,448	0,028	0,812	$y = 0,0026x + 0,3637$		9,774	0,070	0,719	$y = 0,0106x - 0,5347$	
	1250	4,391	0,042	0,957	$R^2 = 0,983$		12,247	0,164	1,335	$R^2 = 0,997$	
	2500	7,085	0,282	3,986			23,878	1,286	5,386		
Isoleucina	100	0,960	0,012	1,237		Fenilalanina	1,161	0,010	0,872		
	200	2,012	0,026	1,282	$y = 0,0107x - 0,4507$		2,386	0,018	0,735	$y = 0,0126x - 0,4777$	
	400	3,968	0,046	1,151	$R^2 = 0,997$		4,670	0,064	1,380	$R^2 = 0,998$	
	600	6,068	0,113	1,869	$y = 0,0101x - 0,0554$		7,326	0,236	3,222	$y = 0,0123x - 0,2244$	
	800	7,809	0,222	2,847	$R^2 = 0,999$		9,226	0,259	2,810	$R^2 = 0,999$	
	1000	10,024	0,091	0,913	$y = 0,0092x + 0,3705$		11,963	0,156	1,304	$y = 0,0118x - 0,0097$	
	1250	12,521	0,133	1,061	$R^2 = 0,998$		14,972	0,138	0,924	$R^2 = 0,996$	
	2500	24,281	1,102	4,540			32,257	0,425	1,317		
Cistina	50	0,060	0,002	2,785							
	100	0,127	0,002	1,373	$y = 0,0012x - 0,0021$						
	200	0,242	0,001	0,472	$R^2 = 0,999$						
	300	0,360	0,015	4,067	$y = 0,0012x - 0,0198$						
	400	0,456	0,027	5,975	$R^2 = 0,996$						
	500	0,618	0,011	1,734	$y = 0,0014x - 0,0473$						
	625	0,776	0,003	0,342	$R^2 = 0,992$						
	1250	1,574	0,108	6,882							

Anexo III



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

Parecer nº. ETIC 0414.0.203.000-09

Interessado(a): Profa. Ana Lúcia Brunialti Godard
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

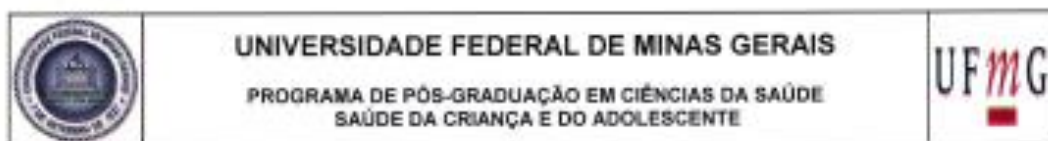
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de dezembro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Consolidação do Serviço de Apoio Diagnóstico de Doenças Genéticas para o SUS**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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 printed name.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo IV



FOLHA DE APROVAÇÃO

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE AMINOÁCIDOS POR HPLC EM SANGUE E URINA
 COLETADOS EM PAPEL-FILTRO NO PERÍODO NEONATAL:
 ESTABELECIMENTO DE VALORES DE REFERÊNCIA E APLICAÇÃO PRÁTICA
 EM ERROS INATOS DO METABOLISMO**

DANIELA MAGALHÃES NOLASCO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Ciências da Saúde.

Aprovada em 27 de junho de 2017, pela banca constituída pelos membros:


 Prof.^a Eugênia Ribeiro Valadares - Orientadora
 UFMG


 Prof.^a Isabel Cristina Pereira Ebertes - Coorientadora
 UFMG


 Prof. Leonardo de Souza Vasconcellos
 UFMG


 Prof. Helvécio Costa Menezes
 UFMG

Belo Horizonte, 27 de junho de 2017.

APÊNDICE

Apêndice I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANÁLISE QUANTITATIVA DE AMINOÁCIDOS POR HPLC EM SANGUE E URINA COLETADOS EM PAPEL-FILTRO NO PERÍODO NEONATAL: ESTABELECIMENTO DE VALORES DE REFERÊNCIA E APLICAÇÃO PRÁTICA EM ERROS INATOS DO METABOLISMO

Coordenadora: Profa. Dra. Eugênia Ribeiro Valadares

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – SL 2005 – CEP:31.270-901 – BH/MG – Tel:(031)3409-4592 / Fax:(31)3409-4516 – e-mail: prpq@coep.ufmg.br

Prezados pais,

Seu filho está sendo convidado para participar de uma pesquisa sobre valores de referência para aminoácidos em sangue e urina coletados em papel-filtro. Esta pesquisa visa saber quais são os valores normais dos aminoácidos no sangue e urina de recém-nascidos.

Para participar desta pesquisa é necessário que o Sr.(a) informe a data de nascimento e sexo de seu filho (a) e permita que 3 a 4 gotas de sangue coletado com lanceta própria no pezinho (na região lateral do calcâneo) de bebês, como feito no “teste do pezinho”. O sangue é colocado em papel-filtro para que a análise de aminoácidos seja realizada. Do mesmo modo, solicitamos uma amostra de sua urina, que pode ser coletada diretamente no papel-filtro quando a criança urinar, podendo o papel-filtro ser colocado deixado na fralda da criança, em contato com sua genitália até que urine. Há a possibilidade de ocorrer riscos e desconfortos relacionados à coleta do sangue, ainda que raros e passageiros, como dor localizada ou hematoma.

Caso a Sr(a) tenha interesse no resultado dos exames do seu filho (a) poderá recebê-lo através de carta, email, whatsapp ou pelo telefone (31)3409-6292, de forma totalmente gratuita. Caso haja alguma alteração seu filho (a) será convocado para consulta médica. Esses resultados não serão repassados para outras pessoas e a sua participação será mantida em completo sigilo. Todas as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e serão usadas somente para fins estatísticos.

Esse estudo vai nos ajudar, a saber, os valores normais de aminoácidos na população sadia e, a partir desta informação, teremos condições de identificar as crianças que apresentam doenças que causam alterações nos seus valores.

Se concordar em participar, respondendo às questões e permitindo o uso do sangue e da urina de seu filho, pedimos que assine esse papel dizendo que entendeu as explicações e está concordando. Se o Sr(a) deseja mais esclarecimentos ou se tem qualquer dúvida sobre a pesquisa nós estamos dispostos a responder qualquer pergunta. Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional. Sua participação é voluntária e se o Sr. não quiser participar ou se quiser desistir em qualquer momento, isso não vai implicar em nenhum prejuízo de qualquer natureza para a sua pessoa ou familiares.

Se seu bebê é recém-nascido, é importante ressaltar que os exames realizados são complementares ao “teste do pezinho” realizados no 5º dia de vida nos postos de saúde. Assim sendo, mesmo participando desta pesquisa, seu filho (a) deverá fazer o “teste do pezinho”.

Tenho ciência do exposto e concordo em participar deste estudo.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 2016.

Assinatura do responsável: _____

Testemunha: _____