UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

DIANA RUFFATO RESENDE CAMPANHOLI

Perfil genotípico de pacientes chilenos com Doença da Urina do Xarope de Bordo

Ribeirão Preto
2019

VERSÃO CORRIGIDA

DIANA RUFFATO RESENDE CAMPANHOLI

Perfil genotípico de pacientes chilenos com Doença da Urina do Xarope de Bordo

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências, programa Saúde da Criança e do Adolescente, opção investigação em Saúde da Criança e do Adolescente.

Área de concentração: Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Simon Camelo Júnior

Ribeirão Preto
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Resende-Campanholi, Diana Ruffato
Perfil genotípico de pacientes chilenos com Doença da Urina do Xarope de Bordo, 2019.
82 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde.
Orientador: Camelo Júnior, José Simon.

1. Erros inatos do metabolismo. 2. Aminoácidos de cadeia ramificada. 3. Valina. 4. Leucina. 5. Isoleucina. 6. Mutação.

RESENDE-CAMPANHOLI, D. R. **Perfil genotípico de pacientes chilenos com Doença da Urina do Xarope de Bordo**. 2019. 82 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2019.

Aprovado em: 17 de Abril de 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Aparecida Maria Fontes
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Ana Maria Martins
Instituição: Universidade Federal de São Paula
Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Carolina Fischinger Moura de Souza
Instituição: Hospital das Clínicas de Porto Alegra
Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. José Simon Camelo Jr
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Julgamento: Aprovada

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese ao meu marido Gustavo e ao meu filho Pedro. Vocês são minha força, meu suporte, minha paz e minha fé.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Gustavo Campanholi pelo apoio, paciência e incentivo para que eu pudesse chegar ao final desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Simon Camelo Jr, pela confiança que desde a graduação muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento pessoal, científico e intelectual. E que nos anos de doutorado mostrou o verdadeiro sentido da palavra apoio e compreensão fazendo-se muito mais que um orientador mas também um grande um amigo.

Aos meus familiares, pelo suporte que sempre me proporcionaram, pelo apoio, presença e carinho; a jornada foi longa e sem minha família, não teria conseguido finalizá-la. Agradecimento em especial a minha sogra Teresa Fátima Gilioli Campanholi e minha mãe, Adriana Ruffato Resende Silva, que me acompanharam nas viagens a Ribeirão Preto para ficarem com o Pedro enquanto eu fazia a coleta de dados e ao meu pai, Sergio Resende Silva pelo apoio sempre incondicional aos meus sonhos! Amo vocês de todo coração!

A aluna de Inciação Científica Ester Borges pela ajuda na coleta de dados e amizade.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr, pela receptividade, atenção, disposição e apoio durante todo o período de análise molecular, contribuindo para meu conhecimento na área.

A Prof Dra Ana Vitória B Margutti, pela receptividade, paciência, atenção, disposição e amizade durante todo o período de aprendizagem das técnicas e interpretação de resultados, ensinando-me e contribuindo desta forma para o desenvolvimento desta pesquisa e conhecimento na área.

À Profa. Dra. Ida Vanessa Doederlein Schwartz, pela atenção, incentivo, apoio e disposição em todas as etapas de desenvolvimento do estudo.

À Profa Dra Verónica Cornejo e toda a equipe do Instituto de Nutrição e Tecnologia da Universidade de Chile (INTA) pelo envio do material e colaboração ativa no processo de analise dos dados clínicos dos pacientes.

A todos os meus amigos que de alguma forma me ajudaram para que este sonho se concretizasse; cada um com sua participação especial em momentos de alegria e desespero, risadas e lágrimas, comemorações e angústias; sempre com palavras de incentivo, apoio e gestos de verdadeira amizade.

A toda equipe e alunos de pós-graduação do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, em especial à Adriana Aparecida Marques e Greice Andreotti de Molfetta pelo trabalho conjunto na elaboração dos resultados desta pesquisa.

À coordenação da Rede DXB, pela iniciativa e parceria para o desenvolvimento deste

estudo.

Aos familiares dos pacientes estudados, pelo consentimento na participação, sem os quais não seria possível realizar este estudo.

Ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Puericultura e Pediatria e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FMRP-USP, pela oportunidade de realização do doutorado.

Às secretárias do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP, pela ajuda em todas as dificuldades.

RESUMO

RESENDE-CAMPANHOLI, D. R. **Perfil genotípico de pacientes chilenos com Doença da Urina do Xarope de Bordo**. 2019. 82 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2019.

Introdução: A Doença da Urina do Xarope de Bordo é uma doença hereditária do metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, de caráter autossômico recessivo. O diagnóstico precoce é fundamental na prevenção da deterioração neurológica, que se dá pela ausência da implementação do tratamento nutricional adequado. **Objetivo:** Realizar triagem das mutações em todos os éxons dos três genes envolvidos na Doença da Urina do Xarope de Bordo (*BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT)* através do sequenciamento gênico direto e correlacionar com a heterogeneidade fenotípica. **Métodos:** Estudo clínico transversal com pacientes chilenos diagnosticados com Doença da Urina do Xarope de Bordo. A genotipagem foi realizada com produtos purificados de reação em cadeia da polimerase (PCR) de DNA.Foi realizada análise *in silico* das substituições de nucleotídeos através dos *softwares MutPred*® v1.2, *Polyphen-2*® – *Polymorphism Phenotyping* v2 e *SIFT*®. As características clínicas dos pacientes foram fornecidas pela equipe de nutrição do Instituto de Nutrição e Tecnologia da Universidade de Chile (INTA). Foi realizado um teste exato de *Fisher* no grupo de pacientes portadores da mutação mais prevalente na amostragem, a I214K com a intenção de avaliar o grau de correlação entre algumas variáveis clínicas e genéticas para verificar a possibilidade de se estabelecer uma relação fenótipo/genótipo. **Resultados:** Dos 18 pacientes 88% apresentaram mutação no gene BCKDHB, 1 pacientes 5% apresentou mutação no gene BCKDHA e 1 (5%) paciente apresentou mutação no gene DBT. Foram encontradas um total de 8 mutações na amostra e 4 novas mutações (50%). Não se pode afirmar que há correlação de nenhuma das variáveis clínicas com os genótipos encontrados nessa amostragem. **Conclusão**: Este estudo reportou 4 novas mutações em pacientes portadores de DXB na população chilena, o que pode ajudar em futuros diagnósticos genéticos da doença. Se a DXB fosse diagnosticada de forma mais rápida, na triagem neonatal, talvez fosse possível estabelecer uma relação genótipo-fenótipo de forma mais eficiente.

Palavras-chave: Erros inatos do metabolismo. Aminoácidos de cadeia ramificada. Valina. Leucina. Isoleucina. Mutação.

ABSTRACT

RESENDE-CAMPANHOLI, D. R. **Chilean patients genotypic profile with Maple Syrup Urine Disease**. 2019. 82 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introduction: Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is an autossomal recessive hereditary disease of the branched-chain amino acid metabolism. Early diagnosis is essential in preventing neurological deterioration, which occurs due to inadequate nutritional implametation treatment. **Purpose**: Screen mutations in all exons from the three genes involved in MSUD (BCKDHA, BCKDHB and DBT) through direct gene sequencing and correlation with phenotypic heterogeneity. **Methods**: A cross-sectional study with Chilean patients diagnosed with Maple Syrup Urine Disease. Genotyping was performed using purified polymerase chain reaction (PCR) DNA. Nucleotide substitutions *In Silico* analysis was performed using MutPre*d*® v1.2, Polyphen-*2*® - Polymorphism Phenotyping v2 and *SIFT*® softwares. Patients clinical characteristics were provided by the nutrition team from Chile University, Nutriton and Technology Institute (INTA). Results: Of the 18 patients, 88% presented mutation in BCKDHB gene, 1 patient had mutation in BCKDHA gene and 1 patient (5%) presented a mutation in DBT gene. A total of 8 mutations in the sample and 4 new mutations (50%) were found. It can not be affirmed that there is correlation between clinical variables and genotypes in this sample. **Conclusion**: This study reported 4 new mutations in patients with MSUD in Chilean population, which may help in future genetic diagnosis. If MSUD was diagnosed more rapidly in neonatal screening, it might be possible to establish a genotype-phenotype relationship more efficiently.

Keywords: Inborn errors of metabolism. Branched-chain amino acids. Valine. Leucine. Isoleucine. Mutation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular dos aminoácidos de cadeia ramificada Leucina, Isoleucina e valina 20

Figura 2 - Vias metabólicas para a degradação dos aminoácidos 21

Figura 3 - Complexo da BCKD**: E1 ou componente descarboxilase** tem 2 subunidades diferentes E1α e E1β. Possui o local ativo que liga a Pirofosfato de tiamina (TPP), que é usada como coenzima. ■ **E2 ou componente aciltransferase** forma o centro deste complexo; tem 3 domínios distintos: O terminal N transporta um resíduo lipoil-lisina na posição 44; o domínio central E1 / E3 liga-se tanto ao E1 como ao E3 e o terminal C forma uma estrutura cúbica sendo o local ativo na interface entre 2 subunidades 23

Figura 4 - Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada. Os aminoácidos valina e isoleucina formam propionil CoA, que pode ser convertido em succinil- CoA. Os AA leucina e isoleucina formam acetil- CoA. O AA leucina pode formar acetoacetato. Na presença da Doença da Urina do Xarope de Bordo, ocorre um déficit enzimático na atividade do complexo desidrogenase dos α-ceto-ácidos de cadeia ramificada e bloqueio do metabolismo no nível 2, havendo acúmulo de leucina, isoleucina, valina e seus metabólitos ácidos α-cetoisocapróico, α-cetoisovalérico e α-ceto-β-metilvalérico 24

Figura 5 - Genes do BCKDHA, BCKDHB e DBT. O gene *BCKDHA* foi mapeado no cromossomo 19, braço longo q, banda 13 sub-banda 2. O gene *BCKDHB* está localizado no cromossomo 6, braço longo q, banda 14, sub-banda 1 e o gene *DBT*, está no cromossomo 1, braço curto p, banda 31 37

Figura 6 - Cromatograma da Mutação em heterozigose P200* encontrada no éxon 5 do paciente 2 a partir de sequenciamento do gene BCKDHB. A sequência superior não mutada apresenta grifo na localização nucleotídica c[.595_596delAG] indicando as bases AG deletadas em destaque após coluna pontilhada 52

Figura 7 - Cromatograma da mutação em heterozigose I214K encontrada no éxon 6 do paciente 4 a partir de sequenciamento do gene BCKDHB. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[641 T>A]indicada pela flecha onde a base T foi trocada por A 52

Figura 8 - Cromatograma da mutação em heterozigose G336S encontrada no éxon 9 do paciente 3 a partir de sequenciamento do gene BCKDHB. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[1006 G>A]. indicada pela flecha onde a base G foi trocada por A 53

Figura 9 - Cromatograma da mutação em homozigose P240T encontrada no éxon 6 do paciente 15 a partir de sequenciamento do gene BCKDHB. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[718 C>A]. indicada pela flecha onde a base C foi trocada por A..... 53

Figura 10 - Cromatograma da mutação em homozigose G131V encontrada no éxon 4 do paciente 13 a partir de sequenciamento do gene BCKDHB. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[392G>T]. indicada pela flecha onde a base G foi trocada por T..... 53

Figura 11 - Cromatograma da mutação em homozigose P356L encontrada no éxon 10 do paciente 17 a partir de sequenciamento do gene BCKDHB. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[1067C>T]. indicada pela flecha onde a base C foi trocada por T..... 54

Figura 12 - Representação esquemática da estrutura do gene BCKDHB e a localização das mutações identificadas no presente estudo; as novas mutações estão apresentadas em negrito. Quadrados pretos: éxons codificantes; linha preta: íntrons; regiões não traduzidas (5' e 3' UTRs)..... 54

Figura 13 - Cromatograma da mutação em homozigose T338I encontrada no éxon 8 do paciente 1 a partir de sequenciamento do gene BCKDHA. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[1013C>T]. indicada pela flecha onde a base C foi trocada por T..... 55

Figura 14 - Representação esquemática da estrutura do gene BCKDHA e a localização das mutações identificadas no presente estudo; as novas mutações estão apresentadas em negrito. Quadrados pretos: éxons codificantes; linha preta: íntrons; regiões não traduzidas (5'e 3' UTRs)..... 55

Figura 15 - Cromatograma da mutação em homozigose G406D encontrada no éxon 10 do paciente 6 a partir de sequenciamento do gene DBT. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[1217G>A]. indicada pela flecha onde a base G foi trocada por A..... 56

Figura 16 - Representação esquemática da estrutura do gene DBT e a localização das mutações identificadas no presente estudo; as novas mutações estão apresentadas em negrito. Quadrados pretos: éxons codificantes; linha preta: íntrons; regiões não traduzidas (5' e 3' UTRs)..... 56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação dos valores de Leucina em µmol/l ao diagnóstico em cada paciente classificado com fenótipo clássico de acordo com a idade de diagnóstico 65

Gráfico 2 - Porcentagem de fenótipos clássicos e intermediários de acordo com a idade de diagnóstico da DXB para cada genótipo em homozigose 66

Gráfico 3 - Porcentagem de fenótipos clássicos e intermediários de acordo com a idade de diagnóstico da DXB para cada genótipo em heterozigose 66

Gráfico 4 - Representação da correlação entre os valores de Leucina em µmol/l e a idade do diagnóstico em dias, com um *p* valor de 0,989 67

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Comparativo entre data do diagnóstico, valor de leucina na data do diagnóstico e retardo de desenvolvimento neuropsicomotor de pacientes portadores da mutação da mesma mutação - I214K em homozigose..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) por grama de proteínas em alimentos naturais 28

Tabela 2 - Recomendação diária de proteína, aporte calórico e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) 29

Tabela 3 - *Primers* utilizados nas PCRs e tamanho dos *amplicons* para o gene *BCKDHA* 46

Tabela 4 - *Primers* utilizados nas PCRs e tamanho dos *amplicons* para o gene *BCKDHB* 46

Tabela 5 - *Primers* utilizados nas PCRs e tamanho dos *amplicons* para o gene *DBT* 47

Tabela 6 - Variações patogênicas detectadas nos genes *BCKDHA, BCKDHB e DBT* dos pacientes chilenos diagnosticados clinicamente com Doença da Urina do Xarope do Bordo 51

Tabela 7 - Mutações já descritas na literatura encontradas em pacientes chilenos diagnosticados com DXB 57

Tabela 8 - Novas mutações encontradas em pacientes chilenos diagnosticados com DXB 57

Tabela 9 - Dados antropométricos dos pacientes no nascimento 58

Tabela 10 - Caracterização dos pacientes chilenos (n=18) diagnosticados clinicamente com Doença da Urina do Xarope de Bordo, que possuíam ficha clínica preenchida pelo profissional responsável INTA 59

Tabela 11 - Valores laboratoriais dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, valina e isoleucina no momento do diagnóstico da DXB em pacientes chilenos acompanhados no INTA 60

Tabela 12 - Sinais e sintomas apresentados pelos pacientes chilenos (n=18) diagnosticados clinicamente com Doença da Urina do Xarope de Bordo, que possuíam ficha clínica preenchida pelo profissional responsável do INTA 61

Tabela 13 - Dados clínicos dos pacientes chilenos portadores de DXB acompanhados no INTA: mutação, data de nascimento, idade do diagnostico, número de hospitalizações e evolução clínica 62

Tabela 14 - Correlação genótipo-fenótipo dos pacientes chilenos (n=18) diagnosticados clinicamente com Doença da Urina do Xarope de Bordo 64

LISTA DE SIGLAS

Asp	Ácido aspártico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Glu	Ácido glutâmico
Ala	Alanina
AA	Aminoácidos
BCAA	Aminoácidos de Cadeia Ramificada
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
BCKDHA	Branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide
BCKDHB	Branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide
CISBi	Centro Integrado de Biologia Sistêmica
Cys	Cisteína
BCKD	Desidrogenase de Cetoácidos de Cadeia Ramificada (Ranched-chain keto-acid dehydrogenase)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DBT	Dihydrolipoamide branched chain transacylase E2
DLD	Dihydrolipoamide dehydrogenase
DXB	Doença da Urina do Xarope do Bordo
DMH	Doenças Metabólicas Hereditárias
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
Phe	Fenilalanina
Stop Codón	Finalizador (do inglês, stop codon)
F	Forward
Gly	Glicina
Gln	Glutamina
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
IMC	Índice de Massa Corporal
INTA	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina

fs	Mudança de matriz de leitura (frameshift)
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de Base
PPM1K Pro	Protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1K Prolina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Rede DXB	Rede Brasileira de Assistência e Pesquisa sobre Doença da Urina do Xarope do Bordo
RDNPM	Retardo do Desenvolvimento Neuropsicomotor
R	Reverse
TA	Temperatura de Annealing
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
HGMD	The Human Gene Mutation Database (Banco de mutações)
Taq	Thermus aquaticus
Tyr	Tirosina
TCM	Triglicerídeos de Cadeia Média
Trp	Triptofano
USP	Universidade de São Paulo
Val	Valina
3'UTR	3' untranslated region
5'UTR	5' untranslated region

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
cm	cm centímetro
g	g gramas
g/Kg	gramas por kilo de peso corporal
g/kg/dia	gramas por kilo de peso corporal por dia
^{o}C	graus celsius
∞	infinito
Kb	kilobase
Kcal/Kg	kilocalorias por kilogramas de peso corporal
kcal/mL	kilocalorias por mililitros
Kg/m^2	kilograma por metro quadrado
µg	micrograma
µL	microlitros
Mol/L	micromoles por litro
mg	miligrama
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/dia	miligrama por dia
mg/Kg	miligrama por kilo
mg/kg/m	miligrama por kilo por metro
mL	mililitro
mL/h	mililitro por hora
mL/kg/dia	mililitro por kilo por dia
ng/µL	nanograma por microlitro
ng/µL	PB nanograma por microlitro pares de base
UI	unidade internacional
U/kg/h	unidade por kilo de peso corporal por hora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
1.1 OS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA (BCAA) 21
1.2 A DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE BORDO 22
1.3 DIAGNÓSTICO DA DXB 26
1.4 TRATAMENTO 26
1.4.1 *Princípios Gerais do Tratamento* 26
1.4.2 *Recomendações Nutricionais* 27
1.4.3 *Tratamento na Fase Aguda* 29
1.4.4 *Tratamento a Longo Prazo* 31
1.4.5 *Monitorização do Tratamento* 34
1.4.6 *Transplante Hepático* 35
1.5 ESTUDO DE BIOLOGIA MOLECULAR NA DXB 36

2 HIPÓTESE 39

3 OBJETIVOS 41
3.1 OBJETIVO GERAL 42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 42

4 METODOLOGIA 43
4.1 PACIENTES 44
4.2 ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES 45
4.2.1 *Desenho de Primers* 45
4.2.2 *Reação em Cadeia da Polimerase - Polymerase Chain Reaction (PCR)* 47
4.2.3 *Sequenciamento do DNA* 48
4.2.4 *Análise das Mutações* 48
4.3 DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES 49
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 49

5 RESULTADOS 50
5.1 ANÁLISE MOLECULAR 51
5.1.1 *Gene BCKDHB* 52
5.1.2 *Gene BCKDHA* 55
5.1.3 *Gene DBT* 55
5.2 PATOGENICIDADE DAS MUTAÇÕES 56
5.3 ANÁLISE CLÍNICA 57
5.3.1 *Avaliação Antropométrica* 57
5.3.2 *Evolução Clínica* 58
5.4 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO 61

6 DISCUSSÃO 69

7 CONCLUSÃO 76

REFERÊNCIAS 78

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Metabólicas Hereditárias (DMH) são causadas por erros inatos do metabolismo e classicamente resultam da falta de atividade de uma ou mais enzimas específicas ou defeitos no transporte de proteínas. A dificuldade no diagnóstico nas DMH deve-se a uma série de fatores:

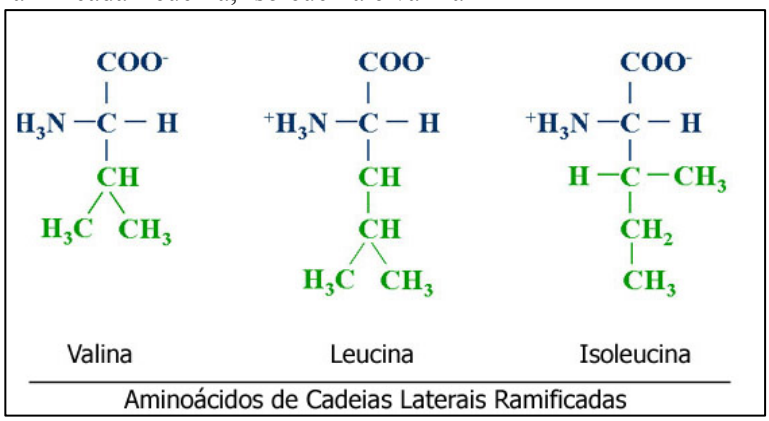
1) São consideradas individualmente raras e têm apresentações bastante inespecíficas, levando muitos médicos à pesquisa dessa etiologia somente quando as causas mais frequentes foram afastadas e por consequência o diagnóstico efetua-se, por regra, tardiamente;
2) As amostras de urina e sangue para investigar um erro metabólico têm um momento certo para serem colhidas;
3) Muitas doenças metabólicas produzem somente anomalias intermediárias, por vezes difíceis de correlacionar com a doença.

Embora possam surgir em qualquer idade, as primeiras manifestações das doenças metabólicas ocorrem geralmente de forma súbita no período neonatal. Os pacientes apresentam sintomas graves que muitas vezes evoluem rapidamente para a morte.

Os aminoácidos de cadeia ramificada - **Leucina** (LEU), **Isoleucina** (ILE) e **Valina** (VAL) - são aminoácidos essenciais em cujo catabolismo se descrevem pelo menos onze doenças metabólicas (Figura 1). As patologias mais frequentes são as acidemias metilmalônica, propiônica e isovalérica e a Leucinose, também conhecida como Doença da Urina de Xarope de Bordo**.**

A Leucinose é uma desordem com consequências ameaçadoras à vida. Contudo é uma patologia controlável se houver uma monitorização e adesão às restrições alimentares.

Figura 1 – Estrutura molecular dos aminoácidos de cadeia ramificada Leucina, Isoleucina e valina



Fonte: Scriver *et* al., 2001.

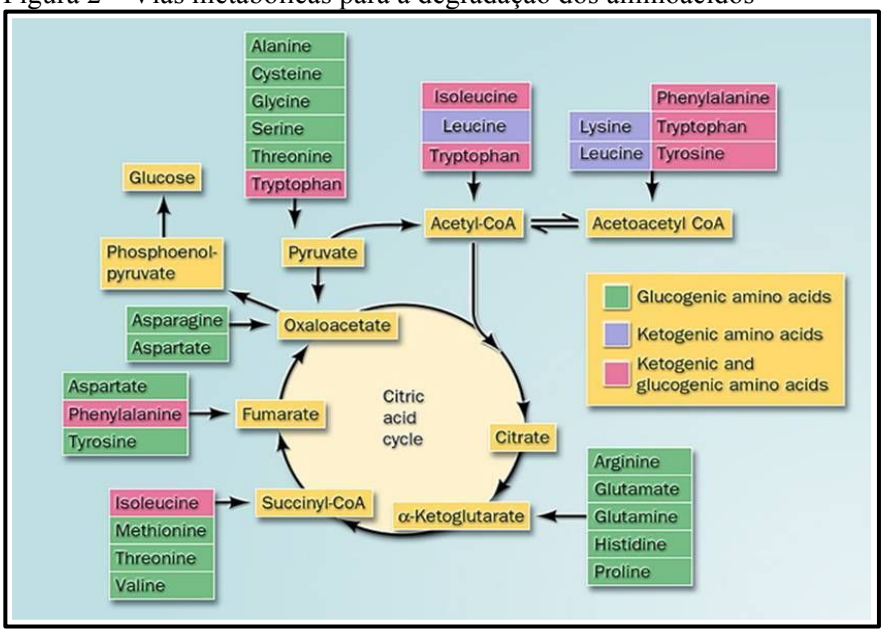
1.1 OS AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA (BCAA)

Os três aminoácidos - **LEU, ILE, VAL** - são classificados como aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, do inglês *Branched Chain Amino Acids*) e são essenciais visto que o organismo não consegue sintetizá-los, sendo obtidos por meio da alimentação (CHUANG; SHIH, 2001).

Os aminoácidos (AA) são resultado do catabolismo das proteínas e serão reutilizados para a síntese de novas proteínas; em excesso podem ser usados como fonte energética. O grupo α-amina é removido e o esqueleto carbonado é convertido em um metabólito intermediário. A maioria dos grupos amina são convertidos em ureia que é excretada na urina, enquanto os esqueletos carbonados são transformados em Acetil CoA, Acetoacetil CoA, Piruvato ou em um dos metabólitos intermediários do Ciclo de Krebs (Figura 2).

Metabolicamente os AA podem classificar-se em: **Cetogênicos** e **Glicogênicos.** Os AA cetogênicos são degradados em Acetil CoA e Acetoacetil CoA, podendo originar corpos cetônicos. Por outro lado os AA. que são degradados até piruvato ou em um dos intermediários do Ciclo de Krebs são designados de glicogênicos. A designação deve-se ao fato deles poderem ser convertidos em Fosfoenolpiruvato (reação de gliconeogênese) e este em glicose. Os AA glicogênicos são fundamentais para a regulação de glicose plasmática durante o jejum.

Figura 2 – Vias metabólicas para a degradação dos aminoácidos



Fonte: Scriver *et* al., 2001.

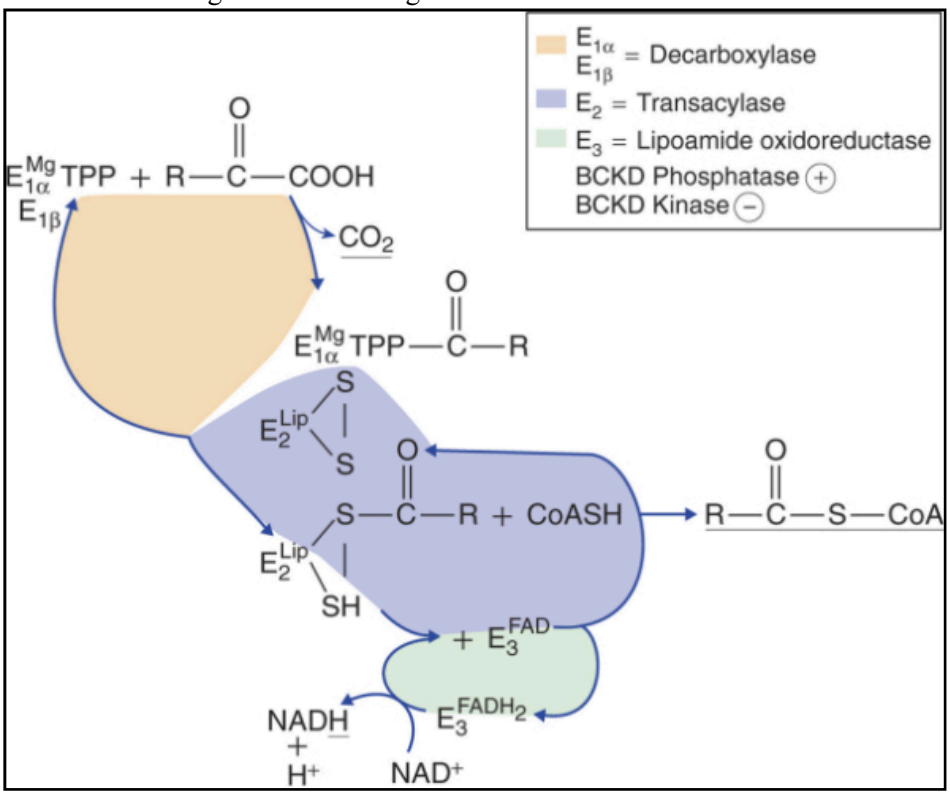
1.2 A DOENÇA DA URINA DO XAROPE DE BORDO

A Doença da Urina do Xarope de Bordo (DXB) (OMIM #24860), também conhecido como Leucinose é um erro inato do metabolismo (EIM) causado pela deficiência da atividade do complexo da desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (BCKD) causando acúmulo de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), leucina (LEU), isoleucina (ILE) e valina (VAL) e seus cetoácidos (BCKA) correspondentes. Os BCAA exógenos, de origem dietética, são os maiores precursores de síntese proteica. O passo inicial no catabolismo da LEU, VAL e ILE é uma transaminação reversível para a formação de cetoácidos: os ácidos α-cetoisocapróico, α-cetoisovalérico e α-ceto-β-metilvalérico e a alo-isoleucina. O Segundo passo é uma descarboxilação oxidativa irreversível, dentro da membrana mitocondrial, reação essa catalisada pelo complexo da BCKD. O complexo da BCKD é uma macromolécula multiezimática com três componentes catalíticos (E1,E2,E3) (STRAUSS; PUFFENBERGER; MORTON, 2013). O componente E1 é constituído de duas subunidades E1α e duas subunidades E1β formando um heterotetrâmero. Os componentes catalíticos requerem como cofatores a tiamina pirofosfato (TPP) e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Em adição aos componentes catalíticos existem duas subunidades reguladoras da atividade do complexo por meio de um mecanismo reversível de fosforilação/desfosforilação: a **quinase** que inativa o complexo - e a **fosfatase** - que faz o contrário. Resumindo, pelo menos seis proteínas estão envolvidas: E1α, E1β, E2, E3, quinase e fosfatase (Figura 3). A deficiência deste complexo é responsável pelo aumento dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, valina e isoleucina nos fluidos fisiológicos, bem como dos seus respectivos α-cetoácidos, como pode ser observado na Figura 4 (CHUANG et al., 2004). O acúmulo destes aminoácidos afeta principalmente o sistema nervoso central (SNC) (CHUANG, 2001). Estudos sugerem a ocorrência de estresse oxidativo nesta doença, mesmo em pacientes tratados (BARSCHAK; MARCHESAN et al., 2008; BARSCHAK; SITTA et al., 2008).

A Doença da Urina do Xarope de Bordo é herdada de forma autossômica recessiva e sua incidência mundial é estimada em 1:185.000 nascidos. Embora seja um defeito raro, em alguns povos Menonitas assentados na Pensilvânia e algumas cidades dos Estados Unidos, a incidência estimada da Doença da Urina do Xarope de Bordo é de 1:200 nascidos vivos (CHUANG; SHIH, 2001). Estudo realizado em Portugal por Quental et al. (2010), com base na análise dos casos diagnosticados por espectrometria de massa, encontrou incidência de 1:86.800

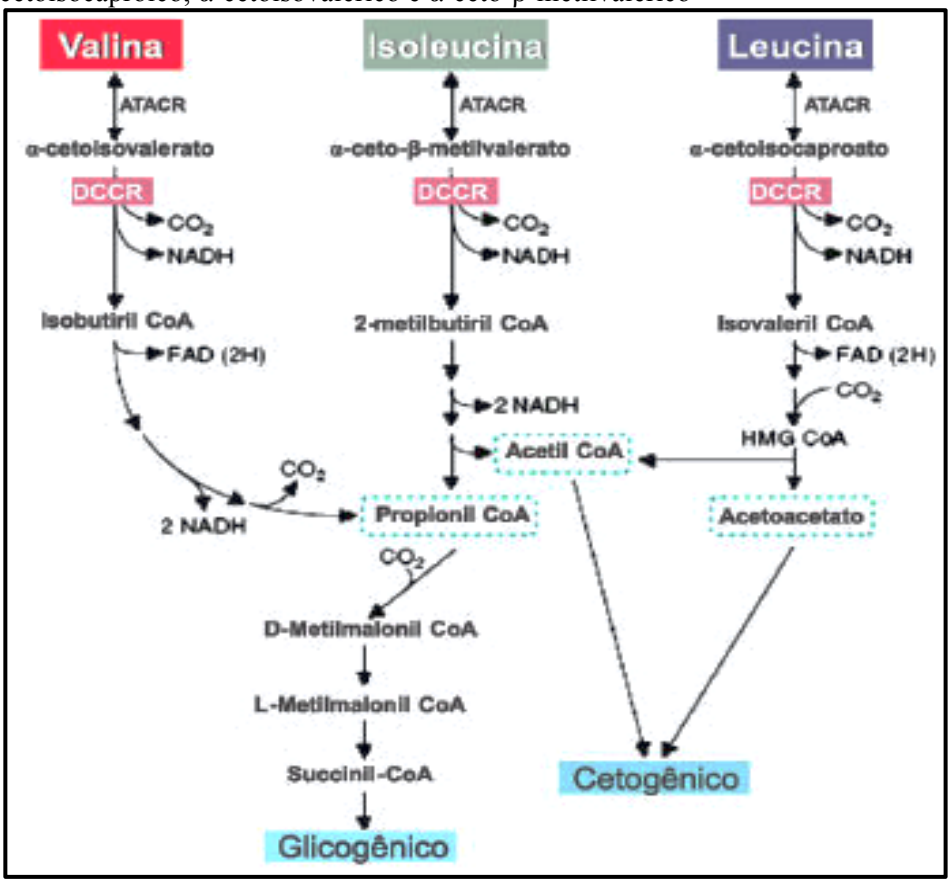
recém nascidos vivos. No Brasil, um estudo feito por Margutti (2015) identificou 11 novas mutações em 25 portadores da doença, sendo tres no gene BCKDHA (Pro39Leu, Gly56Arg, Tyr120Stop e Ala248Cysfs*10), seis no gene BCKDHB (Phe35Trpfs*41, Arg63Pro, Gly131Val, Glu146Glnfs*13, Phe149Cysfs*9, Lys166Asn, Tyr169Cys, Ala202Val, Cys207Phe, Lys211Asn, Ala248Glyfs*6 e c.764_840+4del) e duas no gene DBT (Gly116Arg, Glu148Stop e Glu417Val).

Figura 3 – Complexo da BCKD**: E1 ou componente descarboxilase** tem 2 subunidades diferentes E1α e E1β. Possui o local ativo que liga a Pirofosfato de tiamina (TPP), que é usada como coenzima. ■ **E2 ou componente aciltransferase** forma o centro deste complexo; tem 3 domínios distintos: O terminal N transporta um resíduo lipoil-lisina na posição 44; o domínio central E1 / E3 liga-se tanto ao E1 como ao E3 e o terminal C forma uma estrutura cúbica sendo o local ativo na interface entre 2 subunidades adjacentes. Os 3 domínios estão ligados por regiões charneira flexíveis que são sensíveis à digestão da protease. **E3 ou componente desidrogenase é** partilhado pela Piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase. É uma flavoproteína com estrutura homodimérica que aceita a metade lipoi para a forma oxidada, com NAD+ como receptor de electrões. É também usada nos complexos Piruvato e α-cetoglutarato desidrogenase



Fonte: Scriver *et* al.,2001.

Figura 4 – Catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada. Os aminoácidos valina e isoleucina formam propionil CoA, que pode ser convertido em succinil-CoA. Os AA leucina e isoleucina formam acetil- CoA. O AA leucina pode formar acetoacetato. Na presença da Doença da Urina do Xarope de Bordo, ocorre um déficit enzimático na atividade do complexo desidrogenase dos α-ceto-ácidos de cadeia ramificada e bloqueio do metabolismo no nível 2, havendo acúmulo de leucina, isoleucina, valina e seus metabólitos ácidos α-cetoisocapróico, α-cetoisovalérico e α-ceto-β-metilvalérico



Fonte: Wendel e Baulny (2006, p. 246).

As manifestações clínicas dos pacientes com DXB são variadas e dependem da atividade enzimática residual. Os fenótipos clínicos associados são classificados como forma clássica, intermediária, intermitente, responsiva à tiamina e deficiência de lipoamida desidrogenase (da subunidade E3), dependendo, entre outros, da idade de início e gravidade da doença. Na forma clássica do DXB, com menos de 3% de atividade enzimática residual, os sintomas aparecem logo ao nascimento. Verificam-se cetose e concentrações plasmáticas de LEU superiores a 2.000 μmol/l. Normalmente trata-se de um bebê a termo, com parto e aspecto iniciais normais, surgindo os sintomas entre o quarto e o sétimo dias de vida. É conveniente atentar-se ao fato de que o aleitamento materno pode retardar ligeiramente o aparecimento dos sintomas para a

segunda semana de vida. No neonato não tratado o odor de xarope de bordo pode ser detectado no cerume nas primeiras 12-24h, e na urina em 48-72h após o nascimento. Concentrações plasmáticas elevadas de BCAA, assim como distúrbio generalizado na concentração plasmática de aminoácidos estão presentes 12-24h de idade; elevação de cetoácidos e cetonúria generalizada, irritabilidade, hiporexia são observados em 24-72h após o parto; encefalopatia manifestada como letargia, apnea intermitente e opistótono são vistos após 4 a 5 dias de vida; e coma e insuficiência respiratória central pode ocorrer entre 7 a 10 dias. Outros fenótipos com diferentes graus de atividade podem conduzir a uma intoxicação metabólica grave e quadros de encefalopatia com estresse catabólico (STRAUSS; PUFFENBERGER; MORTON, 2013).

A forma intermédia apresenta-se no lactente e na infância, sendo caracterizada por atraso de desenvolvimento psicomotor, má evolução pondero-estatural, convulsões e ataxia. Verificam-se cetose e concentrações plasmáticas de LEU inferiores a 2.000 μmol/l. Embora as elevações dos BCAA sejam persistentes e ocorra o comprometimento neurológico, não se verificam as descompensações graves típicas no período neonatal das formas clássicas. A atividade enzimática nestes doentes é de 3 a 30% (CHUANG et al., 2004).

A forma intermitente é de apresentação no lactente e infância verificando-se crescimento e desenvolvimento normais, com crises de ataxia que poderão ser acompanhadas de cetoacidose. O aumento dos BCAA apenas se verifica nas descompensações.

A forma sensível à tiamina tem uma apresentação clinica semelhante à forma intermédia ou intermitente, não manifestando descompensação aguda inicial. A tiamina é o cofator da subunidade E1, regulando a atividade de todo o complexo enzimático. Assim, a administração de tiamina, permite diminuir os níveis séricos de BCAA. As doses de tiamina usadas podem variar de 10 a 1.000mg por dia (MITSUBUCHI; OWADA; ENDO, 2005).

A forma deficiente na subunidade E3 possui igualmente um quadro de apresentação clínica semelhante à forma intermédia, embora a elevação dos BCAA se faça acompanhar de acidose láctica e cetoglutárica. Esta forma de apresentação é muito rara, tendo sido descritos cerca de 20 casos em todo o mundo. O prognóstico desta forma da doença parece estar associado à atividade enzimática residual, compreendida entre 0 e 25% (MITSUBUCHI; OWADA; ENDO, 2005).

1.3 DIAGNÓSTICO DA DXB

O diagnóstico da Doença da Urina do Xarope de Bordo é confirmado pela detecção de níveis elevados dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) por análise quantitativa de aminoácidos, utilizando a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), auto analisador de aminoácidos, espectrometria de massa em tandem (LC-MSMS) e/ou pelo aumento da excreção urinária dos α-ceto e hidroxi-ácidos e BCAA usando cromatografia gasosa com sistema de detecção por espectrometria de massa (CG-MS) e análise quantitativa de aminoácidos. **A detecção de alo-isoleucina é patognomônica de Doença da Urina do Xarope de Bordo**, sendo considerada teste de segunda linha e ajuda no diagnóstico diferencial com outras situações associadas a aumento dos BCAA, tais como jejum e episódios de vômitos cíclicos (HOFFMANN; SCHULZE, 2009). As análises das mutações e teste enzimáticos, apesar de desnecessários para o diagnóstico, podem ajudar a predizer a gravidade da desordem ou responsividade à tiamina (NELLIS et al., 2003).

1.4 TRATAMENTO

1.4.1 Princípios Gerais do Tratamento

O tratamento das DMH causadas por déficits no catabolismo dos BCAA obriga a restrição do seu aporte por meio da dieta, no sentido de evitar a acumulação de intermediários tóxicos para os órgãos, particularmente o SNC (CHUANG; SHIH, 2001). Assim, os princípios gerais do tratamento consistem no controle do aporte de proteína natural, na diminuição do catabolismo proteico e na promoção do anabolismo (MITSUBUCHI; OWADA; ENDO, 2005). Como objetivos mais concretos temos a normalização das concentrações plasmáticas dos BCAA e dos seus metabólitos, mantendo o seu aporte adequado bem como de outros nutrientes necessários e fundamentais para um bom desenvolvimento e maturação (CHUANG; SHIH, 2001). Paralelamente, pretende-se prevenir ou minimizar a disfunção cerebral, já que há indícios de que o controle metabólico se relaciona favoravelmente com bom desenvolvimento intelectual (CHUANG; SHIH, 2001).

1.4.2 Recomendações Nutricionais

A diversidade com a qual a doença se apresenta clinicamente é fundamental para avaliar a gravidade e o prognóstico do paciente. A compensação metabólica e a etapa em que é feito o diagnóstico são fundamentais para definir a evolução do caso. Para que o objetivo de compensação metabólica seja alcançado, é de suma importância que seja instituído o tratamento nutricional o quanto antes. A necessidade de cada paciente é diferente de acordo com vários fatores, sendo um deles o genótipo (WENDEL; BAULNY, 2006).

Casella *et* al. (2007) descreveram dois casos de pacientes com DXB que desenvolveram lesões de pele devido a restrição de Val e Ile imposta pelo tratamento da DXB e obtiveram melhora com a suplementação da Ile. Para tal, é necessário que se realize a monitorização continua dos aminoácidos séricos com o intuito de individualizar as necessidades de BCAA de cada individuo. A fórmula contém uma mistura de outros aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e oligoelementos (SERRA DALMAU et al., 2006). A fórmula para DXB tem o custo de, em média, R$ 950,00 por lata e não está inclusa na lista de medicamentos fornecida pelo Governo. Desta forma, solicita-se a fórmula por processo judicial ao Estado para que o paciente receba o tratamento de forma regular, pois a interrupção do tratamento pode levar o paciente a uma descompensação metabólica, podendo resultar em danos irreversíveis.

Por serem essenciais para o desenvolvimento da criança, os pacientes não podem utilizar somente a fórmula alimentar isenta de BCAA, devendo-se fazer a complementação da dieta com proteína natural para que as quantidades mínimas necessárias para o desenvolvimento sejam atingidas. Para crianças menores, utiliza-se como fonte de proteína natural as fórmulas infantis e em crianças maiores e adolescentes, alimentos com baixo valor proteico como as verduras, legumes e frutas.

A Leu é o BCAA que se encontra em maior proporção em alimentos naturais (Tabela 1). O paciente pode ingerir em média 0,5-1,7 g/kg/dia de proteínas naturais dependendo da sua tolerância. O objetivo do tratamento é manter a concentração plasmática de leucina entre 100-300 μmol/L, isoleucina de 200-400 μmol/L e valina 200-400 μmol/L. Além disso, é muito importante obter a quantificação da leucina, pois a conduta terapêutica será baseada nos valores dos aminoácidos no plasma do paciente (SERRA DALMAU et al., 2006).

Tabela 1 – Quantidade de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) por grama de proteínas em alimentos naturais

	Quantidade de BCAA por grama de proteína		
Alimento	Leucina	Isoleucina	Valina
Carne	10%	6-7%	7-8%
Leite de vaca	9,8%	6,4%	6,9%
Verdura	4,6%	3,5%	4,1%
Frutas	4,4%	2,9%	3,7%
Cereais	8,3%	5,8%	6,7%
Manteiga	8,3%	5,8%	6,7%

Fonte: De Luis Román e Izaola Jáuregui (2005, p. 495, tradução nossa).

A tolerância do paciente à Leu vai depender da atividade enzimática apresentada pelo paciente e sua idade, devendo a dieta ser calculada a partir dos níveis séricos de BCAA que o paciente apresenta. A frequência destes controles depende do quadro clínico e da idade do paciente (SERRA DALMAU et al., 2006). Além disso, deve ser considerada a necessidade calórica diária para o paciente, por isso utilizam-se alimentos totalmente isentos de BCAA com alto valor energético como os azeites de oliva, girassol, triglicerídeos de cadeia média (TCM) e maltodextrina.

A tiamina também deve ser utilizada no início da terapia, visto que uma das variantes da doença pode responder a este tratamento. É importante ressaltar que o excesso de restrição dietética causa atraso no crescimento e desenvolvimento global, anemia, imunodeficiência, desmielinização e lesões de pele (SERRA DALMAU et al., 2006).

Na Tabela 2 estão descritas os valores recomendados de proteína, calorias e dos BCAA. Para os recém nascidos portadores da forma clássica da doença, o aporte diário em Leu deverá ficar entre 80 e 110mg/kg (50-60% das necessidades de uma criança normal) (WENDEL; BAULNY, 2006). As necessidades de Leu são maiores durante os primeiros seis meses, estabilizando depois por volta do segundo ou terceiro anos de vida, mantendo-se relativamente estáveis até ao final da primeira década de vida (CHUANG; SHIH, 2001). A Val e a Ile tem como necessidades mínimas 200 a 250mg/dia (WENDEL; BAULNY, 2006).

Tabela 2 – Recomendação diária de proteína, aporte calórico e aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA)

	Proteína (g/Kg)	Leucina (mg/Kg)	Isoleucina (mg/Kg)	Valina (mg/Kg)	Energia (Kcal/Kg)
Recém-nascido	2,5-3	50-90	20-50	30-60	120-145
Lactentes	2-3	40-80	20-50	30-60	115-145
Escolares	1,5-2	20-40	5-15	10-30	60-80
Adolescentes e Adultos	1-2	5-15	5-15	10-30	40-60

Fonte: Adaptado de Wapper e Gibson (2006).

É fundamental deixar bem claro que a mistura de aminoácidos é de importância crucial para estes doentes. Todavia, nas dietas extremamente restritivas, existe alguma evidência de que a mistura possa não ter os efeitos desejados nas taxas de crescimento, uma vez que os aminoácidos são largamente oxidados e excretados sob a forma de ureia (WENDEL; BAULNY, 2006). Neste caso, deve-se dedicar especial atenção à forma como esta mistura de aminoácidos é administrada. Será importante ter em conta o número de tomadas diárias (pelo menos três) e a presença de quantidades adequadas de energia sob a forma glicídica e lipídica, bem como de proteína natural.

Vale lembrar que a ingestão da fórmula deve ser sempre realizada juntamente com outros alimentos prescritos no plano alimentar, de modo a permitir que o organismo utilize preferencialmente os aminoácidos para finalidades anabólicas.

Como orientação, ficam as seguintes recomendações para a administração da mistura de aminoácidos (esta deve ser dada tendo por base a quantidade de aminoácidos/100g de pó):

- 3g/kg/dia de aminoácidos até aos 2 anos de idade.
- 2g/kg/dia de aminoácidos acima dos 2 anos de idade (CHUANG, SHIH, 2001).

Na idade adulta, com a tolerância à Leu próxima de 10 mg/kg/dia (7 a 9g de proteína natural), a mistura de aminoácidos pode mesmo representar cerca de 90% do aporte proteico total (STRAUSS et al., 2006).

1.4.3 Tratamento na Fase Aguda

Com o intuito de proteger o cérebro de danos permanentes, o tratamento na fase aguda, deve consistir na pronta eliminação dos metabólitos tóxicos, combatendo o catabolismo e promovendo o anabolismo. Esta eliminação dos metabólitos pode ser concretizada por meio da depuração exógena (transfusão sanguínea prolongada, diálise peritoneal, hemodiálise

intermitente, hemofiltração) e/ou endógena, induzindo o anabolismo, com início imediato de nutrição entérica rica em glicídios, lipídios e com uma fórmula isenta de BCAA ou iniciando suporte nutricional parenteral (WENDEL; BAULNY, 2006).

A urgência da intervenção é máxima dado que a duração da manutenção de valores de leucina sistematicamente superiores a 1.000µmol/L se correlaciona negativamente com o desenvolvimento intelectual (HOFFMANN; SCHULZE, 2009). A criança terá indicação para a realização de uma depuração exógena sempre que se verifique sintomatologia neurológica grave, deterioração clínica, concentrações de Leu superiores a 1.500µmol/L, intolerância à nutrição entérica ou diminuição das concentrações de Leu inferior a 500µmol/L nas primeiras 24 horas de dieta.

A diálise peritoneal foi inicialmente usada em 1969, com melhorias significativas do estado neurológico em algumas horas. No entanto, embora relativamente simples de implementar, não se demonstra tão eficaz na remoção dos metabolitos tóxicos acumulados comparativamente a outros métodos como hemofiltração contínua (CHUANG; SHIH, 2001).

A hemodiálise intermitente é mais difícil de implementar em recém-nascidos estando por vezes associada a hipotensão e aumento do edema cerebral. A hemodiafiltração também apresenta efeitos colaterais, nomeadamente a sepse, derivada de infecções de cateter, a hipotensão se não houver controle do balanço hídrico e o déficit em aminoácidos essenciais (WENDEL; BAULNY, 2006).

A escolha da técnica vai depender também da disponibilidade e experiência de cada centro de tratamento. A velocidade de descida da Leu deve exceder 750µmol/L a cada 24horas, permitindo atingir uma concentração final de Leu inferior a 400µmol/L, cerca de 2 a 4 dias após o diagnóstico (MITSUBUCHI; OWADA; ENDO, 2005). A combinação dos métodos dialíticos e da nutrição entérica parece oferecer largas vantagens, na medida em que garante uma descida rápida e eficaz das concentrações de Leu; no entanto, para tal é necessário garantir ótimas taxas de fluxo sanguíneo para que a técnica possa ser levada a cabo. Apesar de tudo, desde que o grau de intoxicação não seja muito elevado, a escolha pela promoção do anabolismo dos BCAA em excesso deve ser a medida de eleição, permitindo evitar os custos e os riscos associados às medidas de depuração (FLASCHKER et al., 2007).

Para isso, é necessário diagnóstico precoce da DXB, para que o tratamento possa ser iniciado em fase assintomática, permitindo uma descida gradual da Leu em dois a três dias. A

nutrição enteral contínua deve ser composta por uma mistura de aminoácidos isenta de BCAA, acrescida de uma fonte glicídica e lipídica e com uma concentração final entre 0,7 e 0,9kcal/mL. Esta deve ser iniciada a um débito de 5mL/h durante 6 horas, aumentando 5mL cada 6 horas, o que permitirá um aporte de cerca de 300mL nas primeiras 24 horas. Os suplementos de Val e Ile serão administrados 24 a 48 horas após o início do suporte nutricional, uma vez que os seus níveis plasmáticos podem baixar acentuadamente (CHUANG; SHIH, 2001).

Assim, para evitar que se tornem limitativos para a síntese proteica, deve recorrer-se a uma suplementação de cada um na ordem dos 80 a 120 mg/kg/dia, podendo resultar em valores em torno de 300 a 400mg/dia (WENDEL; BAULNY, 2006). Por outro lado, convém evitar desequilíbrios plasmáticos na relação Leu/Ile, os quais se parecem relacionar com alterações dermatológicas. Quando a relação entre a Leu e a Ile é muito elevada, a resposta ao tratamento revela-se menos efetiva. Concomitantemente, elevando as concentrações de Ile e também de Val, será mais fácil normalizar as concentrações de Leu quando se está com restrição de proteína e de Leu (CHUANG; SHIH, 2001).

Em alternativa à nutrição enteral, a via parenteral pode constituir uma opção para pacientes com descompensação moderada, algum estado de anorexia, ou mesmo em situações mais graves, em combinação com outras estratégias. A nutrição parenteral é normalmente constituída por uma solução de A.A isenta de BCAA, associada a soluções de glicose (8 a 15mg/kg/m), lipídios (2.5g/kg/dia), eletrólitos e vitaminas. A carga hídrica deve ser calculada na base de 130 a 160mL/kg/dia. É aconselhada a monitorização da glicemia (ideal: 100 a 130mg/dL), sendo que para tal pode ser necessário uso de insulina nas doses de 0.1U/kg/h. A administração de largas doses de glicose com a associação da terapêutica insulínica parece ter efeitos favoráveis na estimulação do anabolismo e na normalização das concentrações de Leu (CHUANG; SHIH, 2001).

1.4.4 Tratamento a Longo Prazo

O controle metabólico é um dos principais objetivos no tratamento a longo prazo. É fundamental otimizar a utilização proteica de modo a garantir um bom crescimento e maturação. A concretização destes objetivos irá depender da, já referida, tolerância do doente o que, em última instância, terá relação com o genótipo do mesmo (WENDEL; BAULNY, 2006).

As formas intermédias devem ser tratadas do mesmo modo que as clássicas, embora nos indivíduos com razoável atividade enzimática residual possa bastar uma restrição proteica nos momentos de maior *stress* metabólico. Para além das variações interindividuais, temos também relações intraindividuais relacionadas com fatores como a taxa de crescimento, o estado de saúde e as dificuldades encontradas no processo de alimentação (WENDEL; BAULNY, 2006).

O aporte proteico destes doentes deve maioritariamente ser feito por meio de uma mistura de aminoácidos isenta de BCAA, na quantidade mínima de 2g/kg/dia em aminoácidos. O papel assumido pelas misturas de aminoácidos é bem mais importante do que apenas prevenir ou minimizar as deficiências em aminoácidos essenciais. A entrada de Leu no cérebro e em outros órgãos é mediada por um transportador comum de aminoácidos neutros (L1-NAA-t). Este transportador é inespecífico permitindo a passagem da fenilalanina, triptofano, leucina, metionina, isoleucina, tirosina, histidina, valina e treonina para o meio cerebral. A Leu possui uma elevada afinidade para este transportador sendo que, quando as suas concentrações se encontram elevadas, poderemos encontrar um déficit central de outros aminoácidos que partilham o mesmo transportador (STRAUSS; PUFFENBERGER; MORTON, 2013).

A relação leucina/tirosina muito elevada parece relacionar-se com a distonia por vezes observada na síndrome neurológica aguda de alguns doentes com DXB. Para esta situação, podem concorrer fatores como a baixa afinidade da tirosina para o referido transportador, ou mesmo a sua baixa disponibilidade nas fórmulas das misturas de aminoácidos devido à sua baixa solubilidade. Assim, neurotransmissores que derivem da tirosina, triptofano e histidina podem ser afetados com alterações no transporte dos aminoácidos (STRAUSS; PUFFENBERGER; MORTON, 2013).

A forma de apresentação clássica da mistura de aminoácidos é em pó, porém pode-se encontrar disponível em alguns países europeus outras formas de apresentação, nomeadamente em saquetas. Estas novas formas de apresentação têm boa aceitação pelos pacientes, favorecendo a sua adesão à dieta. Segundo Hallam, Lilburn e Lee (2005), nos pacientes que consomem as quantidades prescritas da mistura de aminoácidos, é esperado um aumento da tolerância à Leu (HALLAM; LILBURN; LEE, 2005). As proteínas naturais poderão ser contabilizadas de acordo com a tolerância verificada em cada situação, de modo a permitir a manutenção dos valores analíticos desejáveis, tentando igualmente assegurar as necessidades indispensáveis à realização

da síntese proteica.

Em situações nas quais a forma da doença o permita, a tolerância poderá ser tal que o aporte de proteínas naturais poderá chegar próximas a atingir as necessidades sem acarretar descontrole metabólico, embora raramente. Inicialmente, o aporte em proteínas naturais é feito por meio do aleitamento materno ou de um leite ou fórmula adaptados (WENDEL; BAULNY, 2006).

Na prática, este último é normalmente adicionado à mistura de aminoácidos, numa quantidade variável de acordo com a tolerância do doente. Esta abordagem é bastante importante, na perspectiva de garantir uma melhoria do anabolismo, uma vez que as misturas de aminoácidos não são utilizadas com a mesma eficácia pelo organismo, comparativamente a leites ou fórmulas com proteína intacta (MITSUBUCHI; OWADA; ENDO, 2005).

Sugere-se a administração da mistura de aminoácidos com os restantes suplementos energéticos isentos de proteína, seguida da colocação do bebê ao peito. Tendo em conta a gravidade da doença, alguns clínicos poderão ter receio em sugerir o aleitamento materno a estas crianças. No entanto, existem descrições de sucesso, por isso se recomenda tentar, ainda que para tal seja necessário retirar o leite materno com bomba, juntando-o à mistura de aminoácidos (WENDEL; BAULNY, 2006).

Posteriormente, a diversificação segue as regras gerais para as crianças sem patologia, embora haja necessidade de restringir os alimentos ricos em proteínas, como os alimentos de origem animal, as leguminosas secas e os frutos secos (WENDEL; BAULNY, 2006).

Para otimizar o controle metabólico da doença é conveniente saber os teores numa quantidade fixa do referido aminoácido nos diferentes alimentos. Deste modo, assegura-se maior facilidade, variedade e compreensão na execução da dieta.

A fração correspondente aos glicídios e lipídios é administrada de acordo com as proporções recomendadas para crianças sem patologia. No entanto, será sempre importante assegurar que o aporte permita a correta utilização dos aminoácidos administrados, ou seja, o seu encaminhamento para processos de síntese. O transplante hepático tem sido realizado em alguns doentes permitindo a liberalização da dieta e evitando o surgimento de descompensações metabólicas mesmo durante as intercorrências infecciosas (STRAUSS et al., 2006; WENDEL; BAULNY, 2006).

1.4.5 Monitorização do Tratamento

A periodicidade do seguimento preconizado é, no que diz respeito às consultas: semanal até aos 2 meses.

- mensal dos 2 aos 24 meses.
- trimestral nas restantes idades. No entanto, pode-se preconizar um seguimento semanal até um ano de vida assim que haja possibilidade para espaçar mais as consultas.

O tratamento a longo prazo ou de manutenção, terá como objetivo primordial a manutenção das concentrações plasmáticas dos BCAA o mais próximo possível da normalidade. Assim, os valores desejáveis são os seguintes:

- Leu: 80-200μmol/L.
- Ile: 40-90μmol/L.
- Val: 200-425μmol/L.

As dosagens dos BCAA devem ser realizadas, segundo Consensos e Recomendações da Sociedade Portuguesa de Pediatria (2007), com periodicidade:

- semanal até um ano de idade.
- quinzenal até aos 3 anos de idade.
- mensal, após os 3 anos de idade, embora a sua frequência possa aumentar em caso de intercorrência infecciosa.

Estes procedimentos constituem a base fundamental da monitorização do tratamento. No entanto, outros parâmetros são igualmente de importância primordial: hemograma, proteínas totais, albumina, ferritina, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. Estes devem ser monitorizados com uma periodicidade:

- semanal no primeiro mês.
- trimestral até um ano de idade.
- semestral, após um ano de idade.

Anualmente, devem ser dosados o IGF1, a pré-albumina, as imunoglobulinas, o zinco, o selênio, as vitaminas lipossolúveis, o ácido fólico e a vitamina B_{12}.

A densitometria óssea deverá ser prática corrente a partir dos seis anos, no sentido de aferir a evolução no ganho de densidade mineral óssea. É também fundamental a realização do

exame neurológico e a avaliação de desenvolvimento psicomotor nas idades chave.

Finalmente, fica evidente a importância do profissional nutricionista no acompanhamento destes pacientes, já que para o sucesso no seu desenvolvimento neuropsicomotor e estrutural, deve-se tomar extrema atenção a dietoterapia empregada para cada caso.

1.4.6 Transplante Hepático

O fígado é responsável por cerca de 15% da produção do complexo enzimático da desidrogenase dos α-ceto-ácidos de cadeia ramificada dependente de tiamina (BCKD). Portanto, o transplante hepático pode restaurar alguma atividade enzimática em pacientes com DXB; diminuição na concentração de leucina tem sido observada horas após a realização do transplante hepático em pacientes com DXB, utilizando doadores falecidos (STRAUSS et al., 2006).

Portanto, o transplante hepático tem sido realizado em alguns doentes permitindo a liberalização da dieta e evitando o surgimento de descompensações metabólicas mesmo durante as intercorrências infecciosas. Esta abordagem terapêutica permite manter concentrações estáveis de BCAA, embora sempre ligeiramente aumentadas na medida em que o músculo e o rim permanecem sem conseguir realizar a sua oxidação (STRAUSS et al., 2006; WENDEL; BAULNY, 2006).

Mesmo assim, deve-se ressaltar que o fígado transplantado poderá oxidar cerca de 90% dos BCAA. As concentrações de alo-isoleucina também não normalizam, mantendo-se bastante elevadas.

Segundo Feier et al. (2014) o transplante hepático fornece controle metabólico, permitindo que o paciente retome uma dieta normal e evita mais danos neurológicos, ajudando no desenvolvimento neurológico do individuo além de eliminar a chance de edema cerebral e morte. Neste relato de caso em questão, Feier et al. (2014), descreveram o caso de uma criança de 2 anos de idade, com DXB que passou por um transplante hepático entre vivos (transplante dominó entre três vivos). A doadora foi a mãe do paciente, e seu fígado foi então usado como enxerto dominó. Porém, a utilização de doadores vivos relacionados tem sido controverso, porque os pais são heterozigotos obrigatórios. Neste caso, porém, os dados sugerem que a utilização de um doador relacionado com DXB foi eficaz, bem como o fígado do paciente DXB foi utilizado com sucesso

no transplante dominó (FEIER et al., 2014).

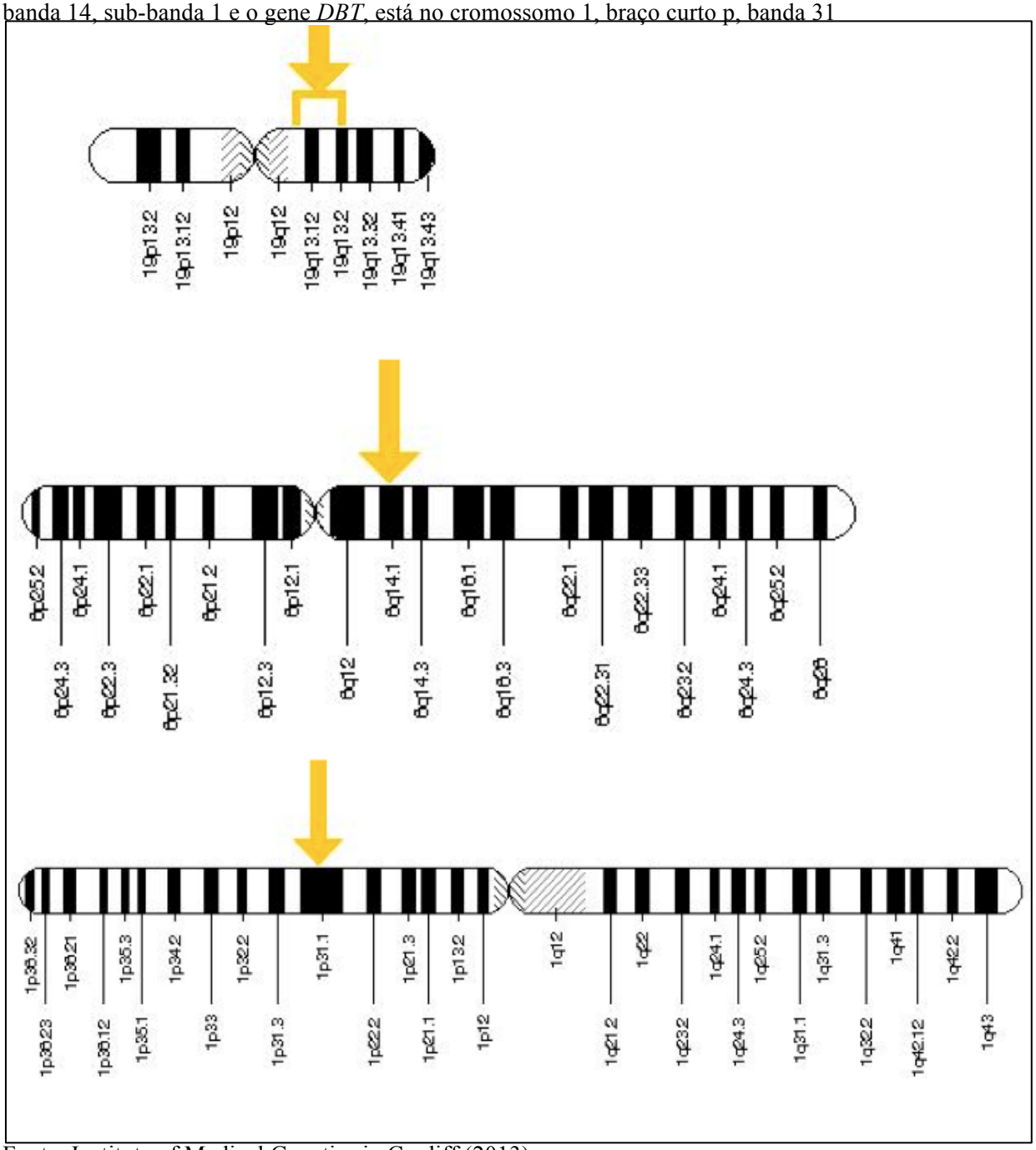
1.5 ESTUDO DE BIOLOGIA MOLECULAR NA DXB

Os estudos moleculares demonstram três diferentes genes envolvidos na doença (MCKUSICK, 2007), os quais codificam cada uma das unidades do BCKD; a heterogeneidade de lócus pode ser, portanto, uma das explicações para a variabilidade clínica encontrada (CHUANG; SHIH, 2001; SERRA DALMAU et al., 2006).

Muitas mutações que causam a DXB já foram descritas nas subunidades catalíticas do complexo de α-cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (BCKD) e, com base nos *loci* alterados, três subtipos genéticos foram propostos: tipo Ia (MIM # 608348) para as mutações encontradas em *BCKDHA* (subunidade E1α); tipo Ib (MIM #248.611) para as mutações encontradas em *BCKDHB* (subunidade E1β) e tipo II (MIM # 248610) para mutações no gene *DBT* (subunidade E2) (FISHER et al., 1991; RODRÍGUEZ-POMBO et al., 2006). O gene *BCKDHA* foi mapeado no cromossomo 19, em 19q13.2. Abrange cerca de 27,2 kb de DNA com sequência codificadora disposta em 9 éxons e cDNA com 1791 pb de comprimento. O gene *BCKDHB* está localizado em 6q14.1, têm aproximadamente 240 kb de DNA genômico, 11 éxons e cDNA de 1572 pb. O gene *DBT*, no cromossomo 1p31, abrange 63 kb de DNA, também possui 11 éxons e cDNA de 10831 pb (1,18). Considerados os 3 genes determinantes da doença, mais de 140 mutações são conhecidas e já foram descritas na literatura (INSTITUTE OF MEDICAL GENETICS IN CARDIFF, 2013), Figura 5.

As alterações genômicas que prejudicam a atividade da BCKD podem ocorrer em qualquer um dos três genes, mas como a herança segue um padrão mendeliano autossômico recessivo, ambos os alelos em um único *locus* de um dos genes deve abrigar uma mutação. O produto proteico alterado ou ausente torna o complexo BCKD inativo. A maioria das mutações descritas afeta o gene *BCKDHA* ou o gene *BCKDHB* (CHUANG; SHIH, 2001; RODRÍGUEZ-POMBO et al., 2006; MCKUSICK, 2007).

Figura 5 – Genes do BCKDHA, BCKDHB e DBT. O gene *BCKDHA* foi mapeado no cromossomo 19, braço longo q, banda 13 sub-banda 2. O gene *BCKDHB* está localizado no cromossomo 6, braço longo q, banda 14, sub-banda 1 e o gene *DBT*, está no cromossomo 1, braço curto p, banda 31



Fonte: Institute of Medical Genetics in Cardiff (2013).

Indivíduos com DXB sempre são homozigotos ou heterozigotos compostos para mutações no gene da mesma subunidade, nenhum indivíduo com DXB que seja heterozigoto para mutações em dois genes relacionados à DXB foi identificado (duplo heterozigoto). A maioria dos indivíduos afetados é heterozigoto composto para mutações raras. Não existe uma determinada

mutação que seja responsável por uma grande proporção dos alelos mutados, exceto em isolados genéticos como a ocorrência da mutação nt1307T>A (Y393N) na comunidade Menonita dos Estados Unidos (FISHER et al., 1991). Como não existem mutações comuns, a abordagem molecular geralmente envolve sequenciamento genético direto.

2 HIPÓTESE

Por meio da abordagem molecular envolvendo sequenciamento gênico dos três genes envolvidos na Doença da Urina do Xarope do Bordo (DXB), estabelecemos a hipótese de que existem mutações novas na população chilena que podem criar um perfil fenotípico característico da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a base genética da Doença da Urina do Xarope do Bordo e correlacionar com a heterogeneidade fenotípica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o padrão de mutações pontuais nos genes *BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT* em uma coorte de pacientes chilenos diagnosticados clinicamente com a Doença da Urina do Xarope do Bordo.
- Avaliar as características clínicas dos pacientes, buscando possível correlação genótipo-fenótipo.

4 METODOLOGIA

4.1 PACIENTES

A equipe de nutrição do Laboratório de genética e enfermidades metabólicas do Instituto de Nutrição e Tecnologia de Alimentos Dr. Fernando Monckenberg Barros, Universidade do Chile (INTA) estabeleceu um acordo com o Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Brasil, para realizar um trabalho colaborativo sobre um estudo molecular das mutações em pacientes chilenos com Doença da Urine de Xarope de Bordo (DXB).

Para esse estudo foram considerados 47 pacientes já diagnosticados com a patologia DXB pelo laboratório do INTA. Durante junho a agosto de 2012 extraiu-se uma amostra de sangue em tubos para extração de DNA (5-10ml) de 36 pacientes que aceitaram participar da pesquisa. Os pais/responsáveis foram informados nesse momento e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido dando sua autorização para esse estudo.

O Hospital das Clínicas de Porto Alegre, por meio da Rede DXB (Rede Brasileira de Assistência e Pesquisa da Doença da Urina de Xarope de Bordo) nos enviou essas amostras de sangue para ser realizada a análise molecular dos três genes envolvidos na doença (BCKDHA, BCKDHB e DBT). A Rede DXB se comprometeu em nos auxiliar financeiramente para a compra dos materiais para toda a análise.

Devido ao longo tempo para a chegada das amostras no Brasil por causa de burocracias de liberação de entrada de material genético em território Brasileiro, e longo tempo de armazenamento até o início da coleta dos dados houve uma degradação do material genético de 18 dos 36 pacientes. Por isso conseguimos fazer a análise molecular apenas desses 18 pacientes.

Todos os pacientes possuem Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a coleta e análise de sangue assinado pelos responsáveis na instituição em que são acompanhados. A coleta de todo o material não foi feita, portanto, nas dependências do HCFMRP-USP. A participação do HCFMRP-USP foi exclusivamente para a realização da análise genética, a fim de caracterizar a base genética da DXB. Salientamos que não houve armazenamento de amostras de DNA dos pacientes no Laboratório. Todo o DNA enviado foi utilizado para o estudo das mutações.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS no 466 de 2012 e na Norma Operacional no 001 de 2013 do CNS, parecer numero 2.252.930.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES

As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro de espectro completo *NanoDrop*® ND-1000, diluídas a 100 ng/µL, e armazenadas a -20ºC. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, com apoio do Núcleo de Apoio à Pesquisa – Centro Integrado de Biologia Sistêmica (NAP – CISBi) da Universidade de São Paulo.

4.2.1 Desenho de Primers

Os *primers forward* e *reverse* dos 30 éxons a serem estudados foram desenhados manualmente com utilização da Referência *GenBank*® com os números de acessos *BCKDHA* NM_000709.3*, BCKDHB* NM_000056.3 *e DBT* NM_001918.2 *(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).* Desenhou-se 30 pares de *primers* com o auxílio de dois *softwares online,* sendo o *UCSC In-Silico PCR* e o *IDT OligoAnalyser 3.1.* Todos os *primers* estão localizados nas regiões intrônicas e os fragmentos amplificados abrangeram todos os *éxons.*

As sequências de bases dos pares de *primers*, assim como os tamanhos dos *amplicons* estão descritos na Tabela 3 (gene *BCKDHA*), Tabela 4 (gene *BCKDHB*) e Tabela 5 (gene *DBT*).

Tabela 3 – *Primers* utilizados nas PCRs e tamanho dos *amplicons* para o gene *BCKDHA*

Primer	**Sequência do Primer**	**Tamanho do *amplicon* em pares de base**
BCKDHA_EX1_F	CTGGTCAGGTTGCCCTCTT	421
BCKDHA_EX1_R	GGACCCCACACTCTGAAGATAG	
BCKDHA_EX2_3F	CACATGCTCAACCACCATG	561
BCKDHA_EX2_3R	CTTGGGAGCCATTCCTTTG	
BCKDHA_EX4_F	ACAGCAACTCGATCCCTCTG	394
BCKDHA_EX4_R	CTGCTCCTGGAAGAACACTCA	
BCKDHA_EX5_F	CTTTCCTGTCTGCCTGCC	392
BCKDHA_EX5_R	AGCACAGACCAGGGCTCTAG	
BCKDHA_EX6_F	CATCAGGAGCTGAGGTGTTTC	460
BCKDHA_EX6_R	ACAGGACGAGAACCAGGAAG	
BCKDHA_EX7_F	GGAGTTGAGGTCCTGAGCAC	406
BCKDHA_EX7_R	AGGAGGAGTGGAAACGGAAT	
BCKDHA_EX8_F	ACTGACAGCCACCGTAGCAT	441
BCKDHA_EX8_R	GGTGTTCCACAAATCCTTCC	
BCKDHA_EX9_F_1	GAGTGGTTAATTCCTTGCCAAG	382
BCKDHA_EX9_R_1	TATTTTAGAGGGAGCTGACTGG	
BCKDHA_EX9_F_2	GAGTGGTTAATTCCTTGCCAAG	684
BCKDHA_EX9_R_2	ACTCCAGGAAACAAAGACCAG	

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4 – *Primers* utilizados nas PCRs e tamanho dos *amplicons* para o gene *BCKDHB*

Primer	**Sequencia do Primer**	**Tamanho do *amplicon* em pares de base**
BCKDHB_EX1_F	CTAGCCCACACTTCCCCTCT	552
BCKDHB_EX1_R	GCAAGGAGGTTCCAGAGAGTC	
BCKDHB_EX2_F	CTCCAGGTCTGTATTGCTTTTGT	383
BCKDHB_EX2_R	GCCCCAATCATACCTTTGAA	
BCKDHB_EX3_F	GTGTGTGTGGTAACTGTCATCCA	684
BCKDHB_EX3_R	CCCAACAGGCAGAATCTCC	
BCKDHB_EX4_F	CCTGTTCTATACTTCTCCATCCCA	307
BCKDHB_EX4_R	GGGTAGCGGCAATACTTGAA	
BCKDHB_EX5_F	AGGAAGAACGGAAGGAGATTG	412
BCKDHB_EX5_R	AACTGGGCATTGGATAGCATA	
BCKDHB_EX6_F	GCCCTTCTTAGCAGCGAGT	405
BCKDHB_EX6_R	CAGATTTCCTCTTTGTTTCCACA	
BCKDHB_EX7_F	GCACAAGTGTCACCTCAGAAAA	482
BCKDHB_EX7_R	ATAGATCTGAAGTGTCCTCGCC	
BCKDHB_EX8_F	CTCCATGCAGATCAGTTCCTG	484
BCKDHB_EX8_R	GCATAAAGGACCCCATTTTGTA	
BCKDHB_EX9_F	CCTGTCGAAAGCGAGTTGTAAC	311
BCKDHB_EX9_R	CTTCTGGAATTGGCATGTGG	
BCKDHB_EX10_F	CGAACATGCTGTTACCTGCTT	391
BCKDHB_EX10_R	CTGATGATTGCTGTGTCTTGG	
BCKDHB_EX11_F	AGCCAAGGTAGTGATGGTGG	690
BCKDHB_EX11_R	CATCCTGGTCATAAAGAACTGAAC	

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5 – *Primers* utilizados nas PCRs e tamanho dos *amplicons* para o gene *DBT*

Primer	**Sequencia do Primer**	**Tamanho do *amplicon* em pares de base**
DBT_EX1_F	CTTCCCTCCCTATTGGTCG	316
DBT_EX1_R	CTCCGTTCTCTGCCCTTTATT	
DBT_EX2_F	CAGAAGGAATTTTGGGTAAGGA	563
DBT_EX2_R	CAATCTGGGCAACTGAGTGA	
DBT_EX3_F	GCCTCTGCCTGAGAACATTC	376
DBT_EX3_R	TGTATGACAAAGTCCTTCACCACT	
DBT_EX4_F	CTGAAAGTAAATGCTGGGCTAGA	552
DBT_EX4_R	ATCTCTTCCTTTTGCTATTGCCT	
DBT_EX5_F	CCCACTCTACCCATACCATTAGG	606
DBT_EX5_R	AGCACCTGACATAAGACCTGGT	
DBT_EX6_F	CCTGATGGTTACCACATGCA	483
DBT_EX6_R	TCTACTGAGGTAGCTTCCCCC	
DBT_EX7_F	GCAGTCAGTGTTCCAGCTTTG	405
DBT_EX7_R	CAAATAAATGTCCTACTCAAGCCTT	
DBT_EX8_F	GGAACTTTGGCTGGTCTGTATC	660
DBT_EX8_R	GCTGCTTCTTTTTGAGAGGGT	
DBT_EX9_10_F	ATGGCAGTGAAGGTTGATCC	542
DBT_EX9_10_R	TGTGTTTAGTCCCTGAATTTGCT	
DBT_EX11_F	GGTTTGCCTGATCTTACACCA	469
DBT_EX11_R	CCCAGGAGAACCATTACACC	

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase – Polymerase Chain Reaction (PCR)

Realizou-se a padronização das reações de PCR definindo temperaturas e concentrações de reagentes e *primers* para o devido sequenciamento genético através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

A primeira etapa da análise molecular dos genes *BCKDHA*, *BCKDHB* e *DBT* foi realizada através da amplificação por PCR de todos os éxons dos três genes com suas regiões intrônicas flanqueadoras.

A amplificação por PCR foi realizada com um volume final de reação de 24,5 µL, contendo *2,0 µL de DNA da amostra (100 ng), 1,5 µL* de cada *primer* na concentração de 2,5%, *2,0 µL de dNTPs, 1,0 µL - 5U de TAQ polimerase (Sigma®), 2,5 µL de tampão - buffer* 10× contendo $MgCl_2$ *(Sigma®).*

Os *eppendorfs* foram colocados em termociclador automático para amplificação de DNA *GeneAmp* (Applied Biosystems®), modelo PCR System 9700. Depois de uma desnaturação inicial a 94º C por 4 minutos, as reações foram amplificadas por 35 ciclos com desnaturação a 94º

C por 35 segundos, *annealing* a uma temperatura média de 60º C (60-63º C) por 40 segundos, extensão a 72º C por 40 segundos e seguido por uma extensão final a 72º C por 5 minutos, mantendo 16º C (∞).

4.2.3 Sequenciamento do DNA

Os produtos da PCR foram analisados por sequenciamento genético direto para a identificação das possíveis mutações. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o kit *BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied®). Para cada reação foi utilizado 1 µL de *primer*, 2 µL de *Big Dye Terminator* v 3.1 (Applied®), 2,0 µL de 5x *Sequencing Buffer* (Applied®), 1,0 µL de Produto PCR, perfazendo um volume final de 10 µL. As placas de sequenciamento foram submetidas ao termociclador automático para amplificação de DNA *GeneAmp* (Applied Biosystems®), modelo PCR System 9700, aquecido a 95º C por 1 minuto, seguido por 25 ciclos a 96º C por 10 segundos, 50º C por 5 segundos e 60º C por 4 min, mantendo 4º C (∞).

Os produtos amplificados foram sequenciados diretamente usando os *primers forward* e *reverse* no sequenciador capilar ABI 3500xL *Genetic Analyzer*, um sistema de análise de DNA de 24 capilares com a tecnologia *Applied Biosystems*® (*Life Technologies*). As corridas foram feitas em capilares de 50cm utilizando polímero POP7 comparando com as sequências de referência do *GenBank*®.

4.2.4 Análise das Mutações

Para confirmar as mutações detectadas no sequenciamento, ambas as fitas (direta e reversa) dos éxons correspondentes foram analisadas. Os resultados do sequenciamento foram visualizados por meio dos programas *FinchTV*® versão *1.4.0 (Geospiza inc. 2004-2006)* comparando as sequências obtidas com as de referência, do banco de dados *GenBank*®.

A patogenicidade das mutações foi verificada por meio de uma análise *In Silico* das substituições de nucleotídeos com a utilização dos *softwares MutPred*® v1.2, *Polyphen-2*® – *Polymorphism Phenotyping* v2 e *SIFT*®.

4.3 DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES

A equipe de nutrição do Laboratório de genética e enfermidades metabólicas do Instituto de Nutrição e Tecnologia de Alimentos Dr Fernando Monckenberg Barros (INTA), da Universidade do Chile forneceu dados clínicos referentes aos pacientes estudados. Os dados clínicos fornecidos foram antropometria ao nascimento, complicações na gestação, data de nascimento, idade do diagnostico, número de hospitalizações, evolução clínica e exames laboratoriais de leucina, valina e isoleucina.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado um teste exato de *Fisher* no grupo de pacientes portadores da mutação mais prevalente na amostragem, a I214K com a intenção de avaliar o grau de correlação entre algumas variáveis clínicas e genéticas para verificar a possibilidade de se estabelecer uma relação fenótipo/genótipo. O teste exato de *Fisher* é um teste de significância estatística mais utilizado na análise de tabelas de contingência com tamanhos amostrais pequenos. A probabilidade de significância adotada foi com p-valor $< 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MOLECULAR

Dos 18 pacientes 88% apresentaram mutação no gene *BCKDHB*, 1 paciente apresentou mutação no gene *BCKDHA* e 1 paciente apresentou mutação no gene *DBT*. Foram encontradas um total de 8 mutações na amostra e 4 novas mutações (50%). As novas mutações encontradas foram c.[1006G>A] e c.[718 C>A], localizadas no gene *BCKDHB*, c.[1013C>T] localizada no gene *BCKDHA* e c.[1217G>A] no gene *DBT* (Tabela 6).

Tabela 6 – Variações patogênicas detectadas nos genes *BCKDHA, BCKDHB e DBT* dos pacientes chilenos diagnosticados clinicamente com Doença da Urina do Xarope do Bordo

Paciente	Gene	Nucleotídeo	Predição Proteica
1	BCKDHA	**c.[1013 C>T] [a]+[1013 C>T] [a]**	**T338I + T338I**
2	BCKDHB	c[.595_596delAG] +[641 T>A]	P200*+I214K
3	BCKDHB	c.[641 T>A] + **[1006 G>A][a]**	I214K + **G336S**
4	BCKDHB	c.[595_596delAG] +[641 T>A]	P200* +I214K
5	BCKDHB	c.[641 T>A] + [641 T>A]	I214K+I214K
6	DBT	**c.[1217G>A][a]+ c.[1217G>A][a]**	**G406D+G406D**
7	BCKDHB	c.[595_596delAG]+ [641 T>A]	P200*+ I214K
8	BCKDHB	**c.[718 C>A][a] + [718 C>A][a]**	**P240T+ P240T**
9	BCKDHB	c.[641 T>A] + [641 T>A]	I214K+I214K
10	BCKDHB	c.[392 G>T] +[595_596delAG]	G131V +P200*
11	BCKDHB	c.[641 T>A] + [641 T>A]	I214K+I214K
12	BCKDHB	c.[641 T>A] + [641 T>A]	I214K+I214K
13	BCKDHB	c.[392 G>T] + [392 G>T]	G131V+ G131V
14	BCKDHB	c[.595_596delAG]+ [641T>A]	P200*+ I214K
15	BCKDHB	**c.[718 C>A][a] + [718 C>A][a]**	**P240T+ P240T**
16	BCKDHB	c[.595_596delAG]+ [641T>A]	P200*+ I214K
17	BCKDHB	c.[1067 C>T] + [1067 C>T]	P356L + P356L
18	BCKDHB	c.[641 T>A] + [641 T>A]	I214K+I214K

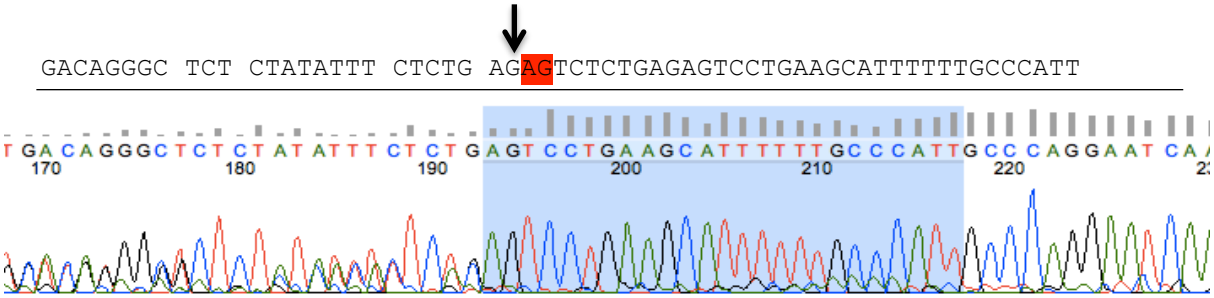
Fonte: Elaborado pela autora.
[a] Novas mutações

5.1.1 Gene BCKDHB

As mutações encontradas no gene *BCKDHB* foram:

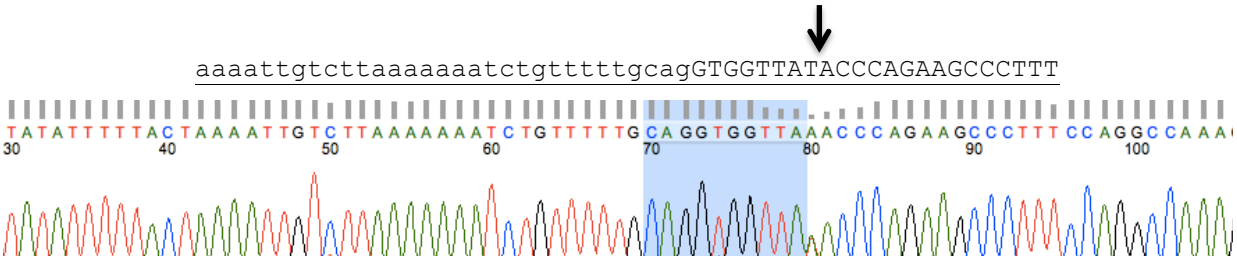
- 1 Deleção com formação de *frameshift*
- ✓ c[.595_596delAG]
- 5 mutações sinônimas com troca se sentido ou *missense,* todas patogênicas
- ✓ c.[641 T>A]
- ✓ c.[1006 G>A]
- ✓ c.[718 C>A]
- ✓ c.[392 G>T]
- ✓ c.[1067 C>T]

Figura 6 – Cromatograma da Mutação em heterozigose P200* encontrada no éxon 5 do paciente 2 a partir de sequenciamento do gene *BCKDHB*. A sequência superior não mutada apresenta grifo na localização nucleotídica c[.595_596delAG] indicando as bases AG deletadas em destaque após coluna pontilhada



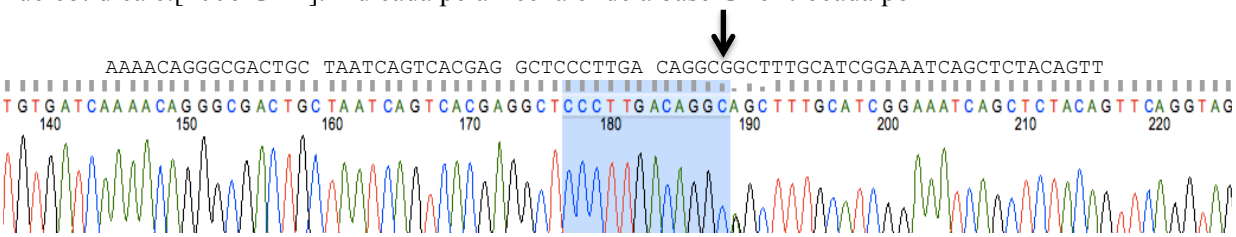
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 7 – Cromatograma da mutação em heterozigose I214K encontrada no éxon 6 do paciente 4 a partir de sequenciamento do gene *BCKDHB*. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[641 T>A] indicada pela flecha onde a base T foi trocada por A



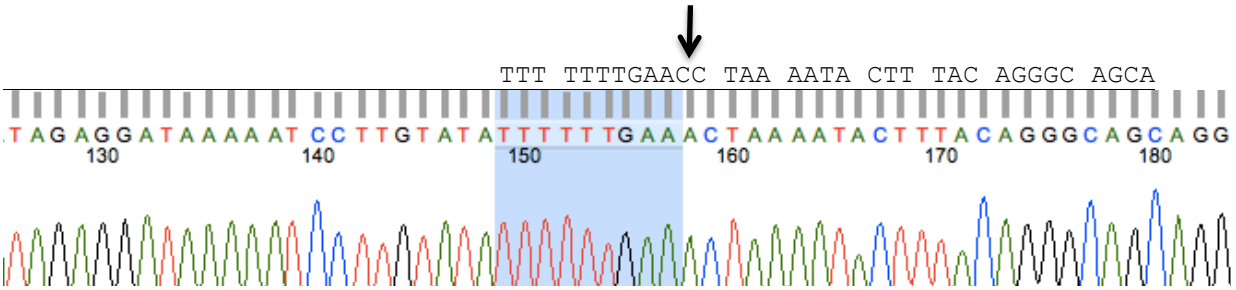
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8 – Cromatograma da mutação em heterozigose G336S encontrada no éxon 9 do paciente 3 a partir de sequenciamento do gene *BCKDHB*. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[1006 G>A]. indicada pela flecha onde a base G foi trocada por A



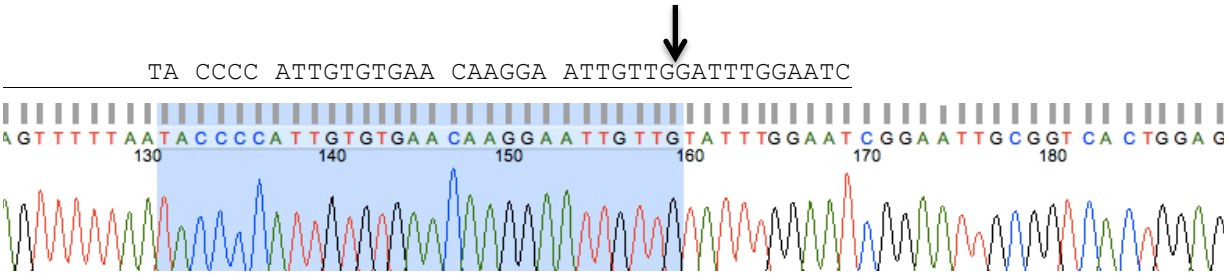
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 9 – Cromatograma da mutação em homozigose P240T encontrada no éxon 6 do paciente 15 a partir de sequenciamento do gene *BCKDHB*. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[718 C>A]. indicada pela flecha onde a base C foi trocada por A



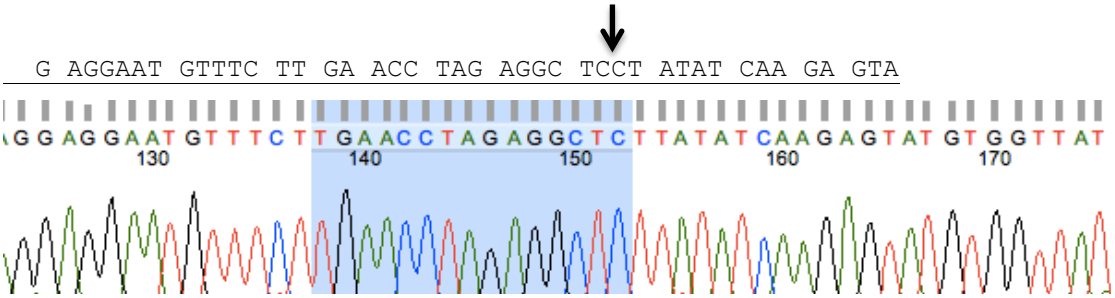
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 10 – Cromatograma da mutação em homozigose G131V encontrada no éxon 4 do paciente 13 a partir de sequenciamento do gene *BCKDHB*. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[392G>T]. indicada pela flecha onde a base G foi trocada por T



Fonte: Elaborado pela autora.

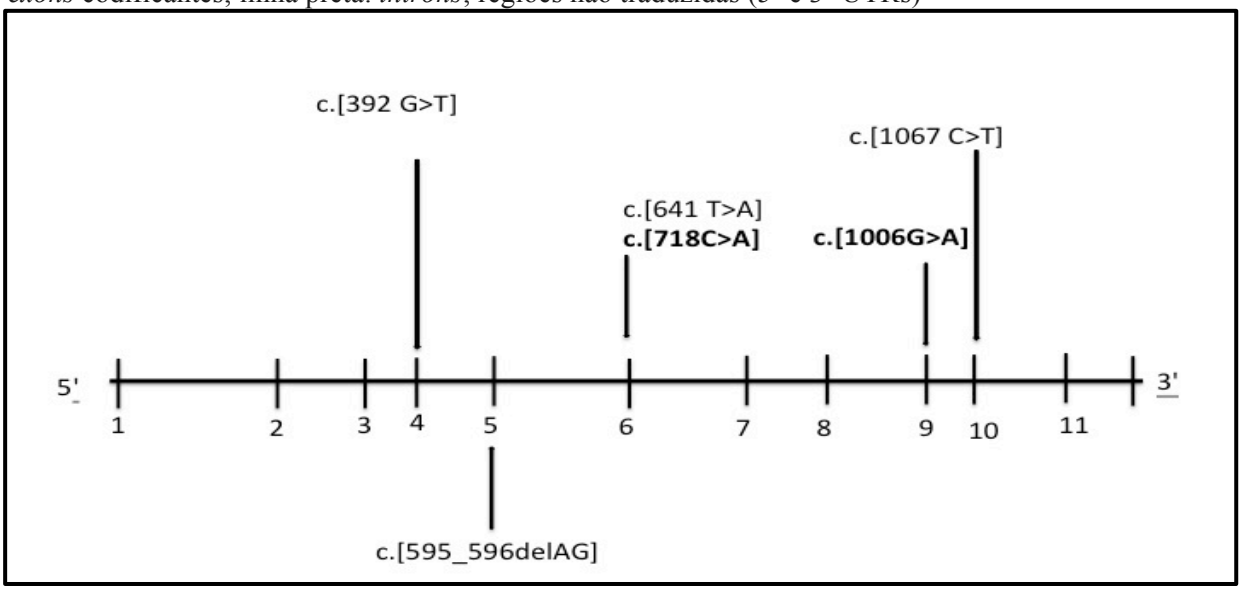
Figura 11 – Cromatograma da mutação em homozigose P356L encontrada no éxon 10 do paciente 17 a partir de sequenciamento do gene *BCKDHB*. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[1067C>T]. indicada pela flecha onde a base C foi trocada por T



Fonte: Elaborado pela autora.

Este estudo foi capaz de encontrar regiões com maiores incidências de mutações, chamadas de *hot spots no* éxon 6 do gene *BCDKHB*. Os éxons 4, 5, 9 e 10 apresentaram 1 mutação em cada, o que pode ser visto na representação esquemática do gene B na Figura 12.

Figura 12 – Representação esquemática da estrutura do gene *BCKDHB* e a localização das mutações identificadas no presente estudo; as novas mutações estão apresentadas em negrito. Quadrados pretos: *éxons* codificantes; linha preta: *íntrons*; regiões não traduzidas (5' e 3' UTRs)



Fonte: Elaborado pela autora.

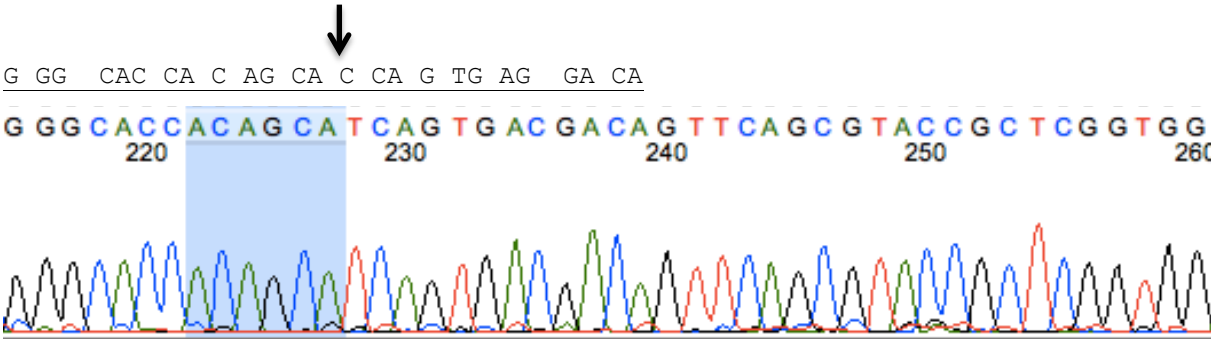
5.1.2 Gene BCKDHA

A mutações encontradas no gene *BCKDHA* :

- 1 mutação sinônima com troca se sentido ou *missense* patogênica

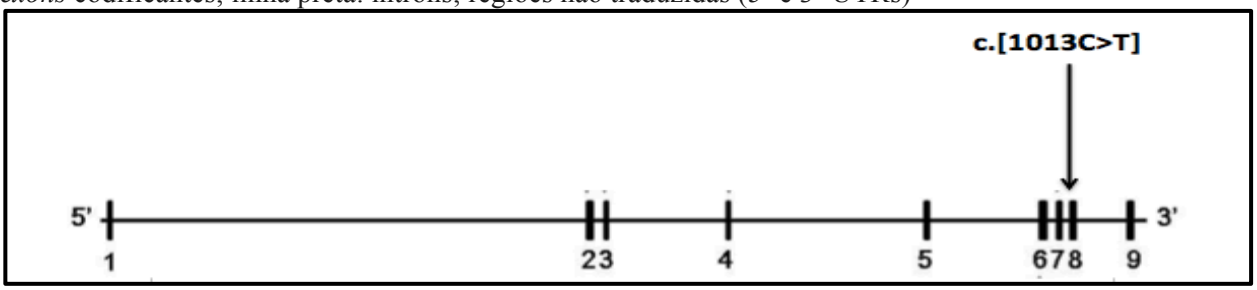
✓ c.[1013C>T]

Figura 13 – Cromatograma da mutação em homozigose T338I encontrada no *éxon* 8 do paciente 1 a partir de sequenciamento do gene *BCKDHA*. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[1013C>T]. indicada pela flecha onde a base C foi trocada por T



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 14 – Representação esquemática da estrutura do gene *BCKDHA* e a localização das mutações identificadas no presente estudo; as novas mutações estão apresentadas em negrito. Quadrados pretos: *éxons* codificantes; linha preta: íntrons; regiões não traduzidas (5' e 3' UTRs)



Fonte: Elaborado pela autora.

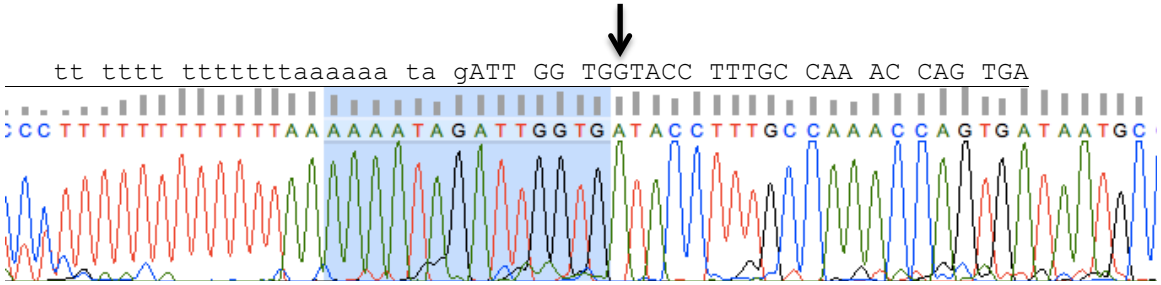
5.1.3 Gene DBT

Mutação encontrada do gene *DBT*:

- Uma mutação com troca de sentido ou *Missense* patogênica.

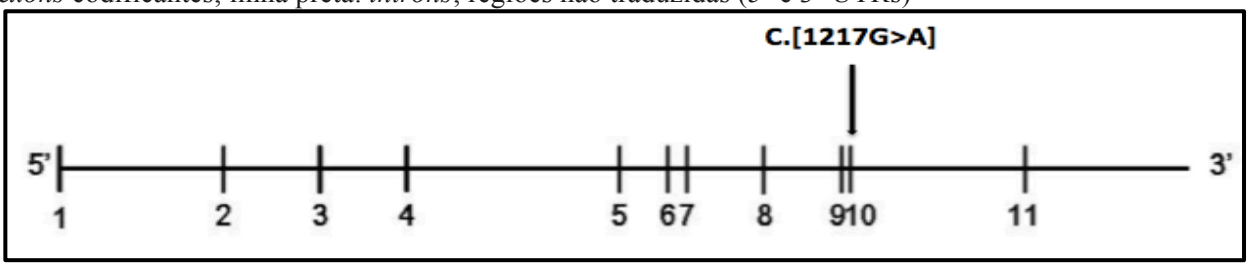
✓ c.[1217G>A]

Figura 15 – Cromatograma da mutação em homozigose G406D encontrada no *éxon* 10 do paciente 6 a partir de sequenciamento do gene *DBT*. A sequência superior não mutada apresenta a localização nucleotídica c.[1217G>A]. indicada pela flecha onde a base G foi trocada por A



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 16 – Representação esquemática da estrutura do gene *DBT* e a localização das mutações identificadas no presente estudo; as novas mutações estão apresentadas em negrito. Quadrados pretos: *éxons* codificantes; linha preta: *íntrons*; regiões não traduzidas (5' e 3' UTRs)



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 PATOGENICIDADE DAS MUTAÇÕES

Das mutações já descritas na literatura a mutação I214K de origem espanhola foi a de maior incidência totalizando 61% dos pacientes seguida da mutação P200* também de origem espanhola em 33% (Tabela 7). Dessas mutações, as encontradas em heterozigose foram G131V, P200*e I214K. As mutações encontradas em homozigose foram G131V e I214K.

Tabela 7 – Mutações já descritas na literatura encontradas em pacientes chilenos diagnosticados com DXB

	Gene	Nucleotídeo	Predição Proteica	Tipo	Origem	Fenótipo	Referência	Frequência na amostra
Éxon 4	BCKDHB	c.[392 G>T]	G131V	M	ND	ND	Margutti AV, 2015	2/18
Éxon 5	BCKDHB	c.[595_596delAG]	P200*	D	Espanhola	Clássico	Henneke M, 2003	6/18
Éxon 6	BCKDHB	c.[641 T>A]	I214K	M	Espanhola	Clássico	Rodriguez-Pombo,2006	11/18
Éxon 10	BCKDHB	c.[1067 C>T]	P356L	M	Portuguesa	Clássico	Quental, 2008	1/18

Fonte: Elaborado pela autora.
ND: Não disponível.
M: Missense.
D: Deleção.

Dentre as novas mutações a de maior incidência foi a P240T localizada no *éxon* 6 do gene *BCKDHB*, encontrada em 16% das amostras. Após serem submetidas a análise *In Silico* as novas mutações foram todas consideradas patogênicas (Tabela 8).

Dessas novas mutações as encontradas em homozigose foram T338I, G406D e P240T. As encontradas em heterozigose foram, P240T e G336S.

Tabela 8 – Novas mutações encontradas em pacientes chilenos diagnosticados com DXB

Região	Gene	Nucleotídeo	Predição Proteica	Tipo	Patogenicidade			Classificação	Frequência na amostra
					Sift®	Polyphen-2®	Multipred®		
Éxon 8	BCKDHA	c.[1013C>T]	T338I	M	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Patogênica	1/18
Éxon 6	BCKDHB	c.[718C>A]	P240T	M	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Patogênica	2/18
Éxon 9	BCKDHB	c.[1006G>A]	G336S	M	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Patogênica	1/18
Éxon 10	DBT	c.[1217G>A]	G406D	M	Patogênica	Patogênica	Patogênica	Patogênica	1/18

Fonte: Elaborado pela autora.
M: Missense.

5.3 ANÁLISE CLÍNICA

5.3.1 Avaliação Antropométrica

Com relação aos dados clínicos podemos observar que o paciente 6 nasceu com 4kg, o que caracteriza um quadro de macrossomia, comum em neonatos de gestantes que apresentaram diabetes gestacional e que foi o caso dessa criança. O paciente de número 10 nasceu com o peso insuficiente, apesar de não ter tido problemas durante a gestação. A mãe da criança de número 14 apresentou pré eclampsia durante a gravidez e essa paciente nasceu com

baixo peso, também um quadro compatível com a complicação na gestação. Setenta e dois por cento (72%) das crianças nasceram com peso e comprimentos adequados para a idade gestacional de acordo com a classificação do *Intergrowth 21*st, como visto na Tabela 9.

Tabela 9 – Dados antropométricos dos pacientes no nascimento

Paciente	Peso ao Nascer (g)	Comprimento ao nascer (cm)	Diagnostico nutricional	Complicações na Gravidez
1	3600	51	AIG	não
2	2825	47,5	AIG	Anemia gestacional
3	2820	48	AIG	não
4	3290	51,5	AIG	não
5	2835	50	AIG	não
6	4000	43	GIG	Diabetes gestacional/ ITU
7	3240	48	AIG	não
8	2830	49	AIG	Colestasia hepática
9	3150	50	AIG	não
10	2600	47	PIG	não
11	3900	52	AIG	não
12	3890	51	AIG	Hidronefrose
13	3050	48	AIG	não
14	1580	42	PIG	Pré eclampsia
15	3300	50	AIG	não
16	2940	49	AIG	não
17	3000	50	AIG	não
18	2750	48	AIG	não

Fonte: Villar et al. (2014).
ND: Não disponível.
ITU: infecção do trato urinário.
PIG: pequeno para a idade gestacional.
AIG: adequado para a idade gestacional.
GIG: grande para a idade gestacional.

5.3.2 Evolução Clínica

De acordo com a idade do aparecimento dos sintomas, 77,7% dos pacientes desta coorte foram considerados com portadores da forma clássica da doença e 22,2% com a forma intermediária. A idade do diagnostico variou de 9 dias de vida a 7 meses. Os níveis de Leucina variaram de 440 a 3962 µmol/l no momento do diagnóstico. Ocorreu retardo no desenvolvimento neuropsicomotor (RDNPM) em 13 das 18 crianças estudadas, sendo que 4 possuíam um grau leve de comprometimento, 3 um grau moderado e 6 um grau grave. Apenas 2 crianças não eram portadoras de RDNPM e 3 crianças não possuíam esse dado disponível. Portanto, das crianças

cujos dados de RDNPM foram disponíveis, a maioria, 40%, possuíam um grau grave de retardo no desenvolvimento neuropsicomotor (Tabela 10). O graus de RDNPM foi avaliado de acordo com a escala de Denver II (FRANKENBURG et al, 1992).

Tabela 10 – Caracterização dos pacientes chilenos (n=18) diagnosticados clinicamente com Doença da Urina do Xarope de Bordo, que possuíam ficha clínica preenchida pelo profissional responsável do INTA

Paciente	Idade do Diagnóstico (dias)	Leucina (µmol/l)	RDNPM	Hospitalização inicial (dias)	Apresentação pela idade do diagnóstico
1	10	741	grave	10	Clássica
2	9	750	grave	10	Clássica
3	14	3560	moderado	7	Clássica
4	13	2638	leve	32	Clássica
5	22	2600	leve	30	Clássica
6	11	750	ND	48	Clássica
7	30	1640	Leve	5	Clássica
8	45	3962	grave	2	Intermediária
9	21	2000	grave	30	Clássica
10	60	993	moderado/grave	20	Intermediária
11	9	440	grave	4	Clássica
12	90	1027	não	32	Clássico
13	17	1090	ND	36	Intermediário
14	30	1716	não	10	Clássica
15	210	1653	leve	90	Intermediária
16	17	1467	moderado	14	Clássica
17	17	1038	grave	ND	Clássica
18	27	2075	ND	10	Clássica

Fonte: Elaborado pela autora.
ND: Não disponível.
RDNPM: retardo no desenvolvimento neuropsicomotor.

Os valores dos exames bioquímicos disponibilizados pelo INTA no momento do diagnóstico da doença nas crianças mostram-se bastante elevados. Os níveis de leucina variaram de 440 a 3962 µmol/l, sendo que a referência para a normalidade desse aminoácido é de 35-217µmol/l, a valina variou de 133 a 1464 µmol/l com normalidade em 51-325µmol/l e a Isoleucina variou de 38 a 759 µmol/l e sua normalidade é de 13-135µmol/l como mostra a Tabela 11.

Tabela 11 – Valores laboratoriais dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, valina e isoleucina no momento do diagnóstico da DXB em pacientes chilenos acompanhados no INTA

Paciente	Idade do Diagnóstico (dias)	Leucina (35-270µmol/l)	Valina (51-325µmol/l)	Isoleucina (13-135µmol/l)
1	10	741	759	402
2	9	750	512	50
3	14	3560	710	512
4	13	2638	585	372
5	22	2600	1180	730
6	11	750	726	657
7	30	1640	174	53
8	45	3962	277	215
9	21	2000	369	190
10	60	993	838	294
11	9	440	1464	759
12	90	1027	117	176
13	17	1090	480	290
14	30	1716	215	525
15	210	1653	1171	586
16	17	1467	466	419
17	17	1038	133	38
18	27	2075	726	170

Fonte: Elaborado pela autora.
ND: Não disponível.

Com relação aos sinais e sintomas apresentados pelos pacientes estudados os mais prevalentes foram a hipotonia axial presente em 83% das crianças, seguida pelo retardo no desenvolvimento neuropsicomotor em 77% dos casos, pelo déficit intelectual em 61% e a intolerância alimentar e urina com odor característico em 55%. Estrabismo, encefalopatia e síndrome piramidal foram relatados em 44% dos pacientes, convulsões em 38%, macrocefalia e necessidade de ventilação mecânica em 27%, gastrostomia e ataxia em 22%, apneia e lesões em mucosa e pele em 16%, síndrome extrapiramidal em 11% e coma em 5% das crianças (Tabela 12).

Tabela 12 – Sinais e sintomas apresentados pelos pacientes chilenos (n=18) diagnosticados clinicamente com Doença da Urina do Xarope de Bordo, que possuíam ficha clínica preenchida pelo profissional responsável do INTA

Sinais e Sintomas	Prevalência
Hipotonia axial	83%
RDNPM	77%
Déficit intelectual	61%
Urina com odor de xarope de bordo	55%
Intolerância alimentar	55%
Estrabismo	44%
Encefalopatia	44%
Sd Piramidal	44%
Convulsões	38%
Ventilação mecânica	27%
Macrocefalia	27%
Ataxia	22%
Gastrostomia	22%
Apnea	16%
Lesões em mucosa e pele	16%
TDAH	14%
Sd Extrapiramidal	11%
Coma	5%

Fonte: Elaborado pela autora.
Sd: síndrome.
RDNPM: Retardo no desenvolvimento neuropsicomotor.
TDAH: Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.

5.4 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Os dados clínicos dos pacientes mostram que os portadores de novas mutações foram diagnosticados com a doença nas primeiras semanas de vida, com exceção do paciente 15, portador da mutação P240T em homozigose que foi diagnosticado com 7 meses de vida. A paciente de número 8 também é portadora da mutação P240T em homozigose e seu diagnóstico foi feito com 45 dias de vida. Tanto a paciente 8 quanto a paciente 15 apresentam sintomas graves da doença. A portadora da nova mutação G406D teve seu diagnóstico com 15 dias de vida e evoluiu com um quadro de encefalopatia, convulsões e óbito (Tabela 13).

As crianças de número 7, 13 e 17 também foram a óbito. Todas as outras crianças apresentaram evolução clínica com sintomas como estrabismo, ataxia, comprometimento

psicomotor, intolerância alimentar, síndrome piramidal e extrapiramidal, encefalopatias, hipotonia axial e convulsões.

Tabela 13 – Dados clínicos dos pacientes chilenos portadores de DXB acompanhados no INTA: mutação, ano de nascimento, idade do diagnostico, número de hospitalizações e evolução clínica

(continua)

Paciente	mutação	Ano de nascimento	Idade do Diagnóstico (dias)	Hospitalizações	Evolução Clínica
1	T338I+T338I[a]	2002	10	ND	ND
2	P200*+I214K	2001	9	5	urina com odor de xarope de bordo, ataxia, síndrome extrapiramidal, hipotonia axial, comprometimento psicomotor grave, macrocefalia
3	I214K+G336S[a]	1995	14	4	estrabismo, urina com odor de xarope de bordo, encefalopatia, ataxia, sd piramidal, intolerância alimentar, hipotonia axial, comprometimento psicomotor
4	P200*+I214K	2006	13	7	estrabismo, ataxia, encefalopatia, sd piramidal, hipotonia axial, comprometimento psicomotor
5	I214K+I214K	2012	22	3	estrabismo, urina com odor de xarope de bordo, sd piramidal, intolerância alimentar, apneia, hipotonia axial, convulsões, comprometimento psicomotor
6 #	G406D+G406D[a]	2001	11	7	encefalopatia, ataxia, sd piramidal, hipotonia axial, convulsões
7 #	P200*+I214K	2004	30	4	sd piramidal, intolerância alimentar, hipotonia axial, convulsões, comprometimento psicomotor, coma
8	P240T+P240T[a]	2004	45	3	urina com odor de xarope de bordo, encefalopatia, intolerância alimentar, hipotonia axial, convulsões
9	I214K+I214K	2003	21	ND	ND
10	G131V+P200*	1997	60	3	urina com odor de xarope de bordo, sd piramidal, hipotonia axial, comprometimento psicomotor
11	I214K+I214K	2006	9	2	urina com odor de xarope de bordo, hipotonia axial, comprometimento psicomotor
12	I214K+I214K	1997	90	1	intolerância alimentar, dermatite, infecção do trato urinário, comunicação Inter atrial

(conclusão)

Paciente	mutação	Ano de nascimento	Idade do Diagnóstico (dias)	Hospitalizações	Evolução Clínica
13#	G131V+G131V	1998	17	3	estrabismo, urina com odor de xarope de bordo, intolerância alimentar, hipotonia axial, convulsões, comprometimento psicomotor grave
14	P200*+I214K	2003	30	2	estrabismo, urina com odor de xarope de bordo, encefalopatia, hipotonia axial, comprometimento psicomotor
15	P240T[a]+P240T[a]	1999	210	3	hipotonia axial, comprometimento psicomotor
16	P200*+I214K	1996	17	ND	broncopneumonia, urina com odor de xarope de bordo, intolerância alimentar, convulsões
17#	P356L+P356L	2000	17	1	estrabismo, comprometimento psicomotor
18	I214K+I214K	2002	27	6	desidratação, estrabismo, sd piramidal, intolerância alimentar, apneia, hipotonia axial, comprometimento psicomotor

Fonte: Elaborado pela autora.
ND: Não disponível.
#: Falecimento.
[a] : Nova mutação.

Como já dito anteriormente, os fenótipos clínicos associados são classificados como forma clássica, intermediária, intermitente, responsiva à tiamina e deficiência de lipoamida desidrogenase (da subunidade E3), dependendo, entre outros, da idade de início e gravidade da doença. Na forma clássica do DXB, com menos de 3% de atividade enzimática residual, os sintomas aparecem logo ao nascimento.

A forma intermédia ou intermediária apresenta-se no lactente e na infância, sendo caracterizada por atraso de desenvolvimento psicomotor, má evolução pondero-estatural, convulsões e ataxia. Embora as elevações dos BCAA sejam persistentes e ocorra o comprometimento neurológico, não se verificam as descompensações graves típicas no período neonatal das formas clássicas.

A forma intermitente é de apresentação no lactente e infância verificando-se crescimento e desenvolvimento normais, com crises de ataxia que poderão ser acompanhadas de

cetoacidose. O aumento dos BCAA apenas se verifica nas descompensações.

A forma sensível à tiamina tem uma apresentação clinica semelhante à forma intermédia ou intermitente, não manifestando descompensação aguda inicial.

Assim, a equipe do INTA classificou o fenótipo de seus pacientes baseado na idade do diagnóstico. Não foram encontrados fenótipos intermitentes e nem sensíveis a tiamina. Entretanto, na amostra enviada, 4 pacientes foram classificados como portadores da forma intermediária da DXB, com diagnóstico feito entre 45 e 210 dias de vida e 14 pacientes com a forma clássica, com diagnóstico feito de 9 a 30 dias de vida (Tabela 14).

A situação clínica desses pacientes variou, apresentando atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (RDNPM) e má evolução, levando, em alguns casos, ao óbito. Dessa forma, dos pacientes com apresentação clássica da doença 4 foram a óbito, 4 apresentaram um RDNPM grave, 2 um RDNPM moderado e 2 um RDNPM leve. Dos pacientes classificados com a forma intermediária 2 evoluíram com um RDNPM grave e 1 leve. Dois pacientes não possuíam dados da situação clínica.

Tabela 14 – Correlação genótipo-fenótipo dos pacientes chilenos (n=18) diagnosticados clinicamente com Doença da Urina do Xarope de Bordo

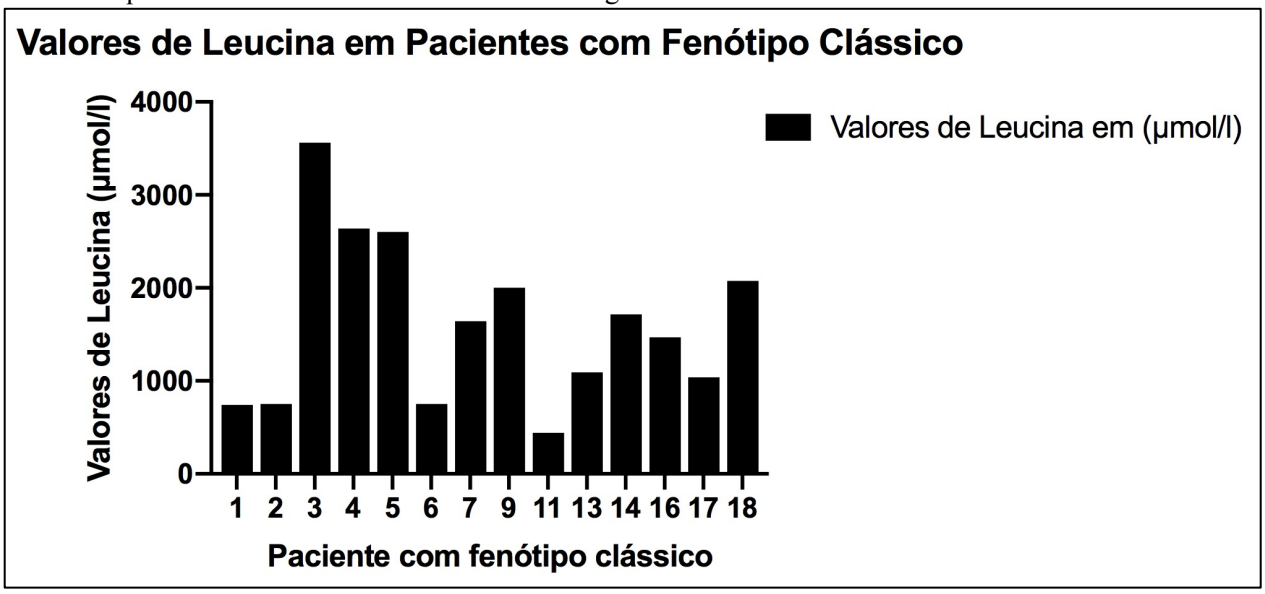
Paci-ente	Ano de Nasci-mento	Hospitaliza-ção Inicial (dias)	Idade do diagnóstico (dias)	LEU (µmol/l)	Situação clínica	Fenótipo	Genótipo
1	2002	10	10	741	grave	Clássico	**c.[1013 C>T] +[1013 C>T] [a]**
2	2002	10	9	750	grave	Clássico	c[.595_596delAG] + c.[641T>A]
3	1995	7	14	3560	moderado	Clássico	c.[641 T>A] + **[1006 G>A][a]**
4	2006	32	13	2638	leve	Clássico	c.[595_596delAG] +c.[641T>A]
5	2012	30	22	2600	leve	Clássico	c.[641 T>A] + [641 T>A]
6	2001	48	11	750	óbito	Clássico	**c.[1217G>A]+ c.[1217G>A][a]**
7	2004	5	30	1640	óbito	Clássico	c.[595_596delAG]+c.[641T>A]
8	2004	2	45	3962	grave	Intermediário	**c.[718 C>A][a] + [718 C>A][a]**
9	2003	30	21	2000	grave	Clássico	c.[641 T>A] + [641 T>A]
10	1997	20	60	993	moderado/ grave	Intermediário	c.[392 G>T] +[595_596delAG]
11	2006	4	9	440	grave	Clássico	c.[641 T>A] + [641 T>A]
12	1997	32	90	1027	ND	Intermediário	c.[641 T>A] + [641 T>A]
13	1998	36	17	1090	óbito	Clássico	c.[392 G>T] + [392 G>T]
14	2003	10	30	1716	não	Clássico	c[.595_596delAG]+ [641T>A]
15	1999	90	210	1653	leve	Intermediário	**c.[718 C>A][a] + [718 C>A][a]**
16	1996	14	17	1467	moderado	Clássico	c[.595_596delAG]+ [641T>A]
17	2000	ND	17	1038	óbito	Clássico	c.[1067 C>T] + [1067 C>T]
18	2002	10	27	2075	ND	Clássico	c.[641 T>A] + [641 T>A]

Fonte: Elaborado pela autora.
ND: Não disponível.

RDNPM: Retardo no desenvolvimento neuropsicomotor.
[a] : Nova mutação.

Os valores de leucina foram muito variáveis. Mesmo nos pacientes com apresentação clássica da doença a LEU variou de 741 µmol/l a 3560 µmol/l como mostrado no Gráfico 1. Por outro lado encontramos valores iniciais de leucina variando de 993 µmol/l a 3962 µmol/l em pacientes com a forma intermediária da doença (Tabela 14).

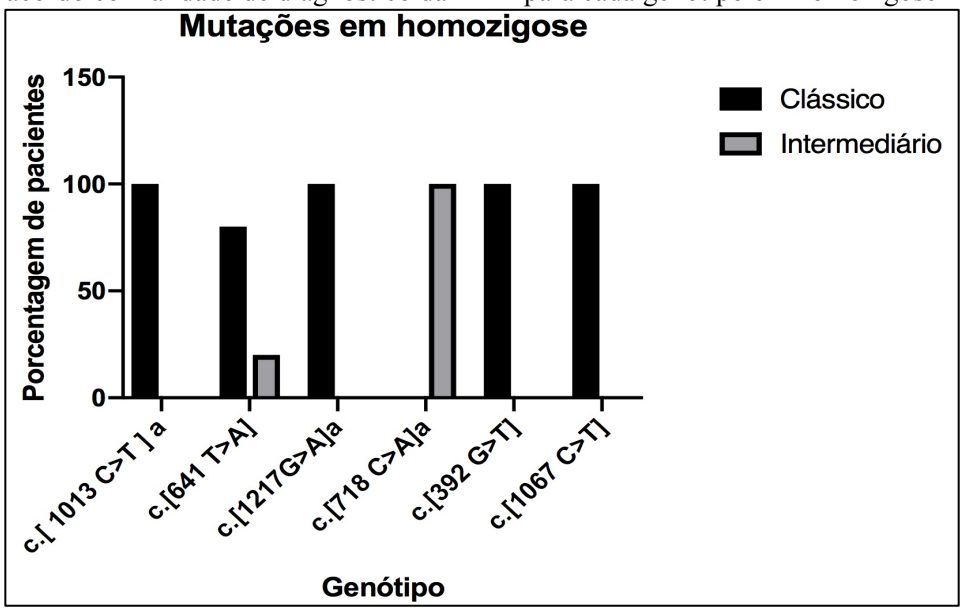
Gráfico 1 – Representação dos valores de Leucina em µmol/l ao diagnóstico em cada paciente classificado com fenótipo clássico de acordo com a idade de diagnóstico



Fonte: Elaborado pela autora.

Na tentativa de fazer uma correlação de genótipo/fenótipo observamos que nas mutações encontradas em homozigose as mutações c.[1013 C>T] ou T338I (**NOVA**), c.[1217G>A] ou G406D (**NOVA**), c.[392 G>T] ou G131V e c.[1067 C>T] ou P357L manifestaram a forma clássica em 100% dos pacientes. A mutação c.[641 T>A] ou I214K apresentou a forma clássica em 80% dos casos o que está de acordo com o relatado na literatura. A **NOVA** mutação c.[718 C>A] ou P240T, quando em homozigose, manifestou a forma intermediária da doença em 100% dos casos deste estudo. (Gráfico 2).

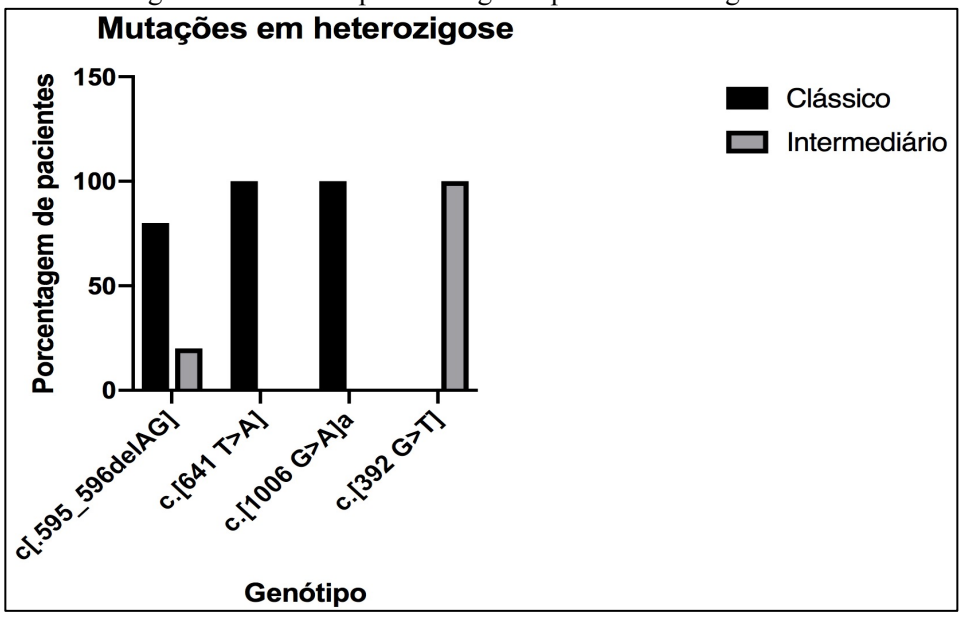
Gráfico 2 – Porcentagem de pacientes com fenótipos clássicos e intermediários de acordo com a idade de diagnóstico da DXB para cada genótipo em homozigose



Fonte: Elaborado pela autora.

Das mutações encontradas em heterozigose a deleção c[.595_596delAG] ou P200* e a *missense* c.[392 G>T] ou G131V, ambas já descritas na literatura, foram observadas em pacientes com fenótipo intermediário. As outras mutações heterozigóticas apresentaram-se em pacientes com fenótipos clássicos (Gráfico 3).

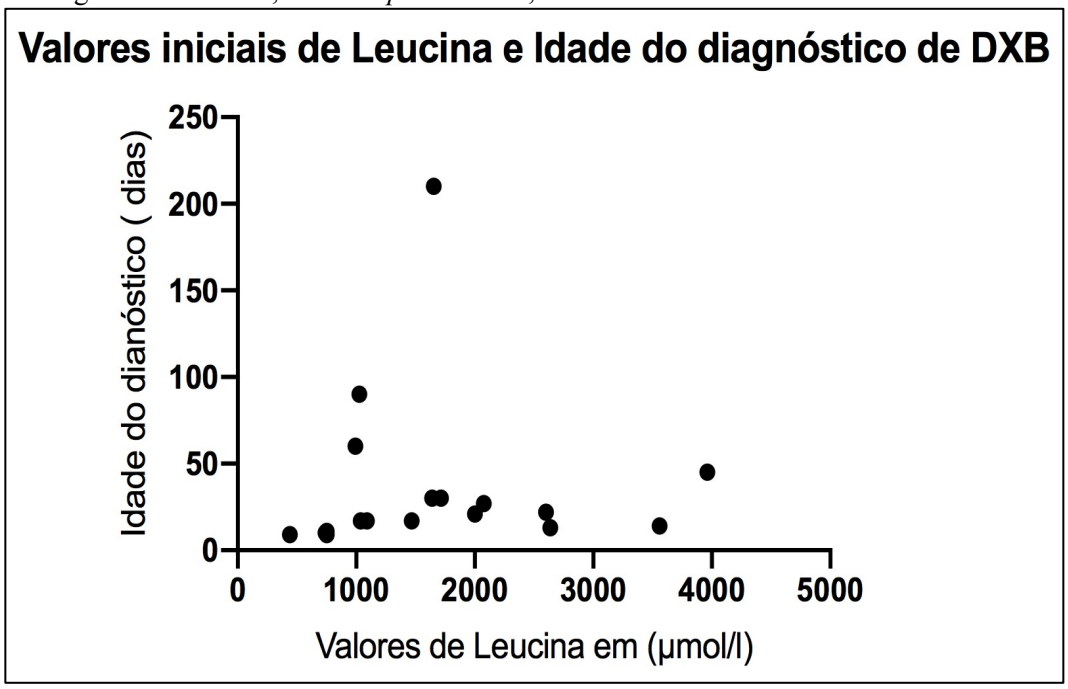
Gráfico 3 – Porcentagem de fenótipos clássicos e intermediários de acordo com a idade de diagnóstico da DXB para cada genótipo em heterozigose



Fonte: Elaborado pela autora.

Foi traçado também, um gráfico representativo da correlação dos valores de leucina e da idade do diagnóstico em dias. Os valores de leucina variaram de forma muito heterogenia com relação à idade do diagnóstico da doença, portanto não foi possível ver nenhuma correlação entre ambos (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Representação da correlação entre os valores de Leucina em µmol/l e a idade do diagnóstico em dias, com um *p* valor de 0,989



Fonte: Elaborado pela autora.

Uma vez que a mutação I214K foi encontrada em 11 das 18 amostras foi possível agrupar informações clínicas desses pacientes na tentativa de se estabelecer uma correlação genótipo/ fenótipo. Foi avaliado, por meio do teste exato de *Fisher* se há correlação entre as variáveis mutação I214K e grau de retardo no desenvolvimento neuropsicomotor, mutação I214K e os fenótipos intermediário e clássico, tipo de alelo (hetero e homozigoto) e grau de RDNPM e o tipo de alelo (hetero e homozigoto) e os fenótipos intermediário e clássico. Nenhuma das correlações encontrou um valor de probabilidade de significância menor que 5%. Dessa forma não se pode afirmar que há correlação de nenhuma dessas variáveis nesta amostragem (Tabela 15).

Tabela 15 – Associações entre os pacientes portadores da mutação I214K: mutação e RDNPM leve/moderada ou grave/óbito; mutação e os fenótipos intermediário e clássico; o tipo de alelo e o RDNPM e o tipo de alelo e o fenótipo

Mutação	RDNPM		TOTAL	P-VALOR
	Leve/Moderada	Grave/óbito		
*Outras	1	6	7	0,282
I214K	4	4	8	

Mutação	Fenótipo		TOTAL	P-VALOR
	Intermediário	Clássico		
*Outras	3	4	7	0,245
I214K	1	10	11	

Alelo	RDNPM		TOTAL	P-VALOR
	Leve/Moderada	Grave/óbito		
Heterozigótico	3	2	5	0,394
Homozigótico	1	2	3	

Alelo	Fenótipo		TOTAL	P-VALOR
	Intermediário	Clássico		
Heterozigótico	0	6	6	0,245
Homozigótico	1	4	5	

p-valor<0,05

Fonte: Elaborado pela autora.
RDNPM: Retardo no Desenvolvimento Neuropsicomotor.
*Outras: as outras mutações do estudo fora a I214K.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo 22% dos pacientes apresentam a forma intermediária da doença e a maioria, 78%, possui a forma clássica principalmente devido ao inicio precoce dos sintomas, com prevalência de mutações em homozigose observada em 61% dos casos. Fato esse interessante uma vez que em nenhum paciente ha relato de consanguinidade entre os pais, e em dois casos há relato de histórico da doença na família. Esse fato mostra, talvez, uma maior homogeneidade da população chilena, quando comparada, por exemplo, a população brasileira.

Os protocolos utilizados no INTA para tratamentos dos pacientes assim que procuravam o service enfatizavam o aumento do anabolismo por meio da dieta em detrimentos do uso de diálises ou hemofiltrações. Durante os períodos de descompensações agudas a taxa de diminuição da leucina plasmática é monitorada como um índice de síntese proteica. O tratamento na fase aguda inclui uso de manitol, furosemide e soluções Salinas hipertonicas para manter ou reestabelecer o sódio sérico e a osmolaridade extracellular, e assim prevenir ou reverter edema cerebral. A excreção de BCAA é monitorada frequentemente em casa e dosadas em cada retorno clinico

A doença do xarope de bordo é diagnosticada incialmente por meio de exames clínicos e do odor peculiar de xarope de bordo na urina. A análise de BCAA sérico é o método mais conveniente, principalmente na triagem neonatal. Se o paciente possui altas dosagens de leucina, valina, isoleucina ou de aloisoleucina (>5 mm/L), a doença deve ser considerada (SCHADEWALDT et al., 1999). Além disso, níveis de leucina superiores a 1.000 µmol/L são considerados críticos, pois podem produzir dano irretratável ou até mesmo levar a óbito (HERBER et al., 2015). Os níveis de leucina ao diagnóstico dos participantes deste estudo variou de 440 a 3962 µmol/L, entretanto a maior parte das crianças (72%) apresentaram leucina superior a 1.000 µmol/L.

A análise urinária de ácido orgânicos ajuda no diagnóstico e no diagnóstico diferencial para outras acidemias orgânicas. Além disso, ensaios enzimáticos e estudos genéticos são importantes para a confirmação diagnóstica. Atualmente mais de 200 mutações associadas ao DXB estão descritas (STENSON et al., 2014).

O Gene *BCKDHB* foi o portador da grande maioria das mutações, 6 das 8 mutações encontradas nesta coorte estão localizadas na subunidade *E1b*. Das mutações já descritas na literatura a mutação I214K foi a de maior incidência totalizando 61% dos pacientes. Dentre as novas mutações a de maior incidência foi a P240T encontrada em 16% das amostras, ambas

localizadas no éxon 6 do gene em *BCKDHB*. Não há estudos na literatura sobre novas mutações e/ou prevalência de mutações na população chilena.

De acordo com Rodríguez-Pombo (2006) e colaboradores a mutação I214K, que está localizada no interior da subunidade beta, é responsável por comprometer a estabilidade dessa região causando uma forma clássica da doença.

Quental et al. (2008) refere que a mutação P356L tem uma manifestação agressiva devido ao efeito único característico da prolina. Esse aminoácido tem uma estrutura rígida que contribui para conferir uma rigidez no *loop* entre a helix 11 e a banda beta. Assim, a substituição da prolina pela leucina aumenta a flexibilidade nessa região e causa um distúrbio na cadeia que pode se dobrar nesse local com consequências graves ao funcionamento da proteína.

A variante P200* gera um stop códon manifestando a forma clássica da doença (HENNEKE et al., 2003).

A mutação G131V afeta a ligação de cofatores na subunidade beta. Não está descrito o efeito fenotípico dessa mutação (MARGUTTI, 2015).

Grande parcela das publicações que descrevem o perfil de mutações da DXB em várias partes do mundo apresenta a distribuição das mutações em diferentes regiões geográficas e étnicas, buscando criar um perfil fenotípico característico da doença, fato que permitiria a análise do efeito fenotípico provável determinado por uma mutação específica ou por um subtipo genético da doença. Contudo, estes estudos mostram que não existem mutações mais frequentes nos pacientes acometidos pela DXB ou que são comuns em determinadas regiões geográficas ou grupos étnicos, além de apontarem, em alguns casos, apenas correlação entre subtipo genético e a forma da doença.

Neste estudo foi possível observar a prevalência de uma mutação. A mutação I214K foi encontrada em 11 dos 18 pacientes, sendo que em 5 desses pacientes ela está em homozigose. Essa é, portanto, uma variante muito comum entre os chilenos, o que contribui com a teoria de uma maior homogeneidade dessa população. A origem dessa variante vem dos colonizadores da região, os espanhóis.

Essa é uma mutação já descrita por Rodríguez-Pombo (2006) como sendo associada a um fenótipo clássico, em nossos achados vemos uma certa variedade com relação aos sintomas dos pacientes portadores dessa mutação. Os pacientes 5, 9, 11, 12 e 18 são portadores da I214K em homozigose, enquanto as crianças 9 e 11 apresentam um RDNPM grave, a criança 5 possui

leve e a criança 12 e 18 não possui dados de RDNPM. Outro fator a ser considerado é o nível de leucina inicial e a evolução da doença; observa-se que o paciente 5 com níveis de leucina ao diagnóstico de 2600 µmol/l apresentou um RDNPM leve enquanto que o paciente 11 com leucina de 440 µmol/l tem RDNPM grave. Dessa forma também não encontramos associação entre os níveis iniciais de leucina e a gravidade da doença.

Quadro 1 – Comparativo entre data do diagnóstico, valor de leucina na data do diagnóstico e retardo de desenvolvimento neuropsicomotor de pacientes portadores da mutação da mesma mutação - I214K em homozigose

Paciente	Idade do Diagnóstico	Leucina no diagnóstico µmol/l	RDNPM
5	22 dias	2600	Leve
9	21 dias	2000	Grave
11	9 dias	440	Grave
12	90dias	1027	ND
18	27 dias	2075	ND

Fonte: Elaborado pela autora.

Os pacientes 11 e 12 são irmãos e possuem a mesma mutação, entretanto os valores iniciais de leucina são muito diferentes. Além disso, o paciente 12 é o mais velho, nasceu em 1997, demorou 90 dias para ter seu diagnóstico de DXB enquanto que o irmão mais novo, nascido em 2006, já com histórico da doença na família obteve o diagnóstico em tempo muito menor, de 9 dias. Tanto a tecnologia para o diagnóstico da doença mais avançada quanto o aconselhamento genético que essa família já possuía interferiram na velocidade do diagnóstico, inicio do tratamento e, claro, na evolução da doença.

Esse fato também pode ser verificado na nova mutação encontrada nesses estudos, a P240T, que, em homozigose, evoluiu no paciente 8 com um RDNPM grave e no paciente 15 um RDNPM leve. Mas em ambos a idade do diagnóstico foi mais tardio, o que contribui com a teoria de que essa mutação possa ter uma apresentação fenotípica intermediária.

Apesar dos níveis de leucina apresentarem-se altos ao diagnóstico na maioria dos pacientes considerados críticos, podendo produzir danos irreversíveis ou até mesmo a morte (HOFFMANN; SCHULZE, 2009), o resultado de um estudo brasileiro (HERBER et al., 2015) sobre o panorama da DXB nas duas últimas décadas no Brasil não apontou associação significativa entre a gravidade de atraso de desenvolvimento mental e os níveis de leucina no momento do diagnóstico, o que está de acordo com as nossas observações. Isso pode ser atribuído ao fato de que o controle metabólico a longo prazo pode ser considerado um fator determinante mais decisivo do desenvolvimento psicomotor e cognitivo do que os níveis iniciais de LEU (HOFFMANN; SCHULZE, 2009).

Neste estudo, a maior parte das mutações localiza-se no gene *BCKDHB* que

apresentaram manifestações do fenótipo clássico em sua maior parte, com exceção da nova mutação P240T que apresentou-se em pacientes com fenótipo intermediário. Entretanto, os dados clínicos, principalmente os valores de leucina ao diagnóstico, possuem valores inconsistentes com o fenótipo clássico e intermediário nesses pacientes. Espanhóis estudados por Rodríguez-Pombo et al. (2006) que possuíam mutação no gene *BCKDHB* (subtipo Ib) apresentavam o fenótipo clássico, porém encontraram inconsistências entre os parâmetros bioquímicos dos pacientes e fenótipo clínico, como o caso de três pacientes portadores da mesma mutação em homozigose e que apresentaram atividade enzimática residual variável entre <1 a 13%, fato descrito também em outros estudos anteriormente (RODRÍGUEZ-POMBO et al., 2006).

Verifica-se que, considerando a idade do diagnóstico da doença, dentre as novas mutações, a T338I, G336S e G406D possuem uma manifestação clássica, com aparecimento mais precoce dos sintomas. Apenas a P240T apresentou início dos sintomas mais tardio, falando a favor de um fenótipo intermédio, entretanto, um dos grandes problemas é o tempo dispendido entre início dos sintomas e diagnóstico da doença em locais sem triagem neonatal para a DXB como é o caso do Chile. Um dos pacientes com a mutação P240T em homozigose considerado com fenótipo intermédio pela idade do diagnóstico ficou 90 dias internado. Seu diagnóstico foi com 210 dias de vida, mas quanto tempo passou-se entre início dos sintomas e esse diagnóstico é desconhecido. Vale ressaltar, como já discutido antes, que os valores bioquímicos de BCAA e a evolução clínica desses pacientes não foi condizente com o descrito na literatura para esses fenótipos clínicos.

Sendo assim, quanto a característica e situação clínica dos pacientes, acredita-se não ser a melhor forma de correlacionar fenótipo e genótipo pelo fato da deterioração neurológica estar diretamente associada a ausência de diagnóstico precoce e assim ausência da implementação do tratamento nutricional adequado, os quais são fundamentais para o controle dos níveis sérios dos BCAA e seus metabólitos (controle metabólico). Em um estudo de Morton et al. (2002) no qual os pacientes tiveram acesso à formula e um protocolo clínico foi seguido no estágio agudo da doença, o resultado geral foi melhor e os pacientes atingiram um desenvolvimento mais adequado.

Apesar de alguns pacientes terem sido diagnosticados ainda no primeiro mês de vida, sabe-se que, o tempo entre o diagnóstico e o recebimento da fórmula metabólica é longa e variável. Quando os pacientes são diagnosticados na fase aguda da doença, durante uma

internação hospitalar por descompensação metabólica, inicia-se o tratamento com fórmula metabólica no momento do diagnóstico, se a fórmula estiver disponível no hospital de admissão. Por outro lado, pacientes diagnosticados em fase não aguda da doença e tratados ambulatoriamente, ficam propensos a receber a fórmula tardiamente e normalmente a garantia de acesso à fórmula metabólica ocorre somente através de medida judicial (HERBER et al., 2015).

Dessa forma se a DXB fosse diagnosticada de forma mais rápida, na triagem neonatal, talvez fosse possível estabelecer uma relação genótipo-fenótipo de forma mais eficiente. A DXB atende à maioria dos critérios de Wilson e Jungner (1968) para a triagem: por exemplo, existe uma fase latente reconhecível ou sintomática precoce e um tratamento aceito para pacientes com confirmação da doença. Em países onde a DXB está incluída na triagem neonatal, os pacientes normalmente são diagnosticados antes do 10° dia de vida. Por outro lado, em países onde a DXB não está incluída nos programas públicos de triagem neonatal, como o Chile, o diagnóstico normalmente é postergado.

O estudo de Flaschker et al. (2007) que descreveu mutações em 15 indivíduos da Alemanha, Áustria e Suíça, com diferentes variantes fenotípicas da DXB concluiu que, na coorte de pacientes analisada, os fenótipos enzimáticos e clínicos mais graves das formas da doença (variantes DXB) foram associados principalmente com genótipos específicos no gene *BCKDHA*, considerando que fenótipos enzimáticos e clínicos mais leves foram associados com genótipos específicos nos genes *BCKDHB* e *DBT;* os resultados deste estudo levaram a conclusão de que a genotipagem pode ser preditiva de fenótipo metabólico e clínico, podendo ter valor prognóstico particularmente em indivíduos com variante de DXB identificadas na triagem neonatal, para que o tratamento precoce retarde o curso natural da doença.

Pacientes com a forma intermitente da doença, avaliados por Tsuruta et al. (1998) apresentaram exclusivamente mutações no gene *DBT*, dando origem a baixa, mas significativa atividade residual do complexo *BCKD*. Porém, no presente estudo, nenhum paciente com o subtipo genético EII apresentou esta forma fenotípica da doença.

Wang et al. (2012) afirmam o sequenciamento do DNA atrelado a análise *In Silico* como um método simples e rápido para predição da gravidade da DXB, além da triagem neonatal ter sido apontada como uma abordagem eficaz para triagem de pacientes com DXB em população étnica variada, permitindo a intervenção precoce com o tratamento dietoterápico (RODRÍGUEZ-POMBO et al., 2006; FLASCHKER et al., 2007; QUENTAL et al., 2008;

WANG et al., 2012).

Os portadores de DXB necessitam de uma restrição alimentar por toda a vida, além de monitoramento rigoroso de níveis de aminoácidos de cadeia ramificada para prevenir danos cerebrais (STRAUSS; PUFFENBERGER; MORTON, 2013).

O diagnóstico precoce e o tratamento são cruciais para reduzir a gravidade do dano cerebral (STRAUSS; PUFFENBERGER; MORTON, 2013).

O tratamento da DXB inclui dieta pobre em proteína, suplementação com fórmula isenta de BCAAs e tratamento sintomático durante crises metabólicas, como ingestão de manitol para tratar edema encefálico, injeção de insulina para diminuir a glicemia e uso de *D-carbamilglutamato* para reduzir níveis séricos de amônia (YOSHINO et al., 1999).

Como o fígado é responsável por 15% da produção de *BCKD*, o transplante de fígado pode restaurar alguma atividade enzimática em pacientes com DXB (STRAUSS; PUFFENBERGER; MORTON, 2013; DÍAZ et al., 2014). O transplante hepático pode beneficiar portadores da forma clássica entretanto não reverte o processo da doença (DÍAZ et al., 2014). Portadores de DXB com um fígado estruturalmente normal podem também doar seu fígado para pacientes que não possuem defeitos na *BCKD* (FEIER et al., 2014).

Um estudo de Feier e colaboradores observou a evolução de quatro pacientes portadores de DXB tratados com o transplante hepático de doadores vivos parentes do paciente. Eles foram acompanhados por um tempo de aproximadamente 19 meses após o transplante e seus dados metabólicos e clínicos foram comparados com pacientes que receberam transplantes de doadores mortos sem parentesco. Não houve diferença entre ambos e os pacientes desse estudo conseguiram liberar a dieta e os níveis de BCAA e leucina reduziram drasticamente (FEIER, el al., 2016).

L-carnitina beneficia pacientes com DXB por meio de prevenção danos oxidativos celulares (GUERREIRO et al., 2015). L-carnitina pode também prevenir in vitro danos ao DNA em células leucocitárias periféricas (MESCKA et al., 2014). Além disso, norleucina, que compete com a leucina na barreira encefálica foi considerada efetiva em diminuir encefalopatias e aumentar a taxa de sobrevivência em modelos experimentais de formas intermediárias de DXB e formas clássicas (ZINNANTI et al., 2009).

O diagnóstico pré-natal é importante para identificar defeitos ao nascimento, especialmente em condições de difícil tratamento. Análise genética precisa da probanda

possibilitou o diagnóstico pré-natal baseado no DNA de desordens de um único gene. You et al. (2014) reportaram um caso de uma família chinesa portadora de DXB associada a mutações no gene *BCKDHA*; o diagnóstico pré-natal para o feto foi feito. No estudo de Li et al. (2015) um diagnóstico pré-natal para uma mutação no gene *BCKDHB* também foi feita. Em ambos os casos o tratamento foi iniciado ao nascimento e o diagnóstico foi possível devido ao conhecimento da mutação existente na família.

Uma vez que a mutação I214K foi muito prevalente nessa coorte de pacientes talvez uma idéia seria fazer a genotipagem para a detecção dessa variante na população chilena como sugestão de triagem.

7 CONCLUSÃO

Não há estudos na literatura sobre novas mutações e/ou prevalência de mutações na população chilena. Nesse estudo foram encontradas um total de oito mutações nessa coorte de pacientes. Quatro dessas oito mutações não estão descritas na literatura. Seis das oito mutações encontradas estão localizadas no gene *BCKDHB* e o *éxon* 6 desse gene foi o local que apresentou as mutações mais frequentes nessa população a I214K presente em 77% dos pacientes. As novas mutações encontradas foram T338I, G336S, G406D e P240T das quais a de maior incidência foi a P240T, também localizada no gene *BCKDHB*.

Considerando a idade do diagnóstico da doença, dentre as novas mutações, a T338I, G336S e G406D possuem uma manifestação clássica, com aparecimento mais precoce dos sintomas. Apenas a P240T apresentou inicio dos sintomas mais tardio, falando a favor de um fenótipo intermédio. No entanto, um dos grandes problemas observados é o tempo dispendido entre inicio dos sintomas e diagnóstico da doença em locais sem triagem neonatal para a DXB como é o caso do Chile, fazendo essa classificação fenotípica por idade do diagnóstico questionável. Vale ressaltar que os valores bioquímicos de BCAA e a evolução clínica desses pacientes também não foram condizente com o descrito na literatura para esses fenótipos clínicos.

Não encontramos associação entre os níveis iniciais de leucina e a gravidade da doença. Isso pode ser atribuído ao fato de que o controle metabólico a longo prazo pode ser considerado um fator determinante mais decisivo do desenvolvimento psicomotor e cognitivo do que os níveis iniciais de LEU.

Quanto a características e situação clínica dos pacientes, acredita-se não ser a melhor forma de correlacionar fenótipo e genótipo no Chile uma vez que em países que não possuem a DXB no programa de triagem neonatal o tempo entre início dos sintomas e diagnóstico da doença pode ser longo e pelo fato de que a deterioração neurológica está diretamente associada a ausência de diagnóstico precoce e ausência da implementação do tratamento nutricional adequado, os quais são fundamentais para o controle dos níveis sérios dos BCAA e seus metabolitos.

Apesar de alguns pacientes terem sido diagnosticados ainda no primeiro mês de vida, sabe-se que, o tempo entre o diagnóstico e o recebimento da fórmula metabólica é longa e variável. Dessa forma se a DXB fosse diagnosticada de forma mais rápida, na triagem neonatal, talvez fosse possível estabelecer uma relação genótipo-fenótipo de forma mais eficiente.

REFERÊNCIAS

BARSCHAK, A. G., MARCHESAN, C. et al. Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. **Clin. Biochem.**, Tarrytown, v. 41, n. 4-5, p. 317-324, 2008.

BARSCHAK, A. G., SITTA, A. et al. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. **Metab. Brain. Dis.**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 71-80, 2008.

CASELLA, E. B. et al. Lesões de pele do tipo acrodermatite enteropática em duas crianças com doença da urina de xarope do bordo. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, p. 159-162, 2007.

CHUANG, D.; SHIH, V. Maple syrup urine disease (Branched-chain ketoaciduria). In: SCRIVER, C. et al. (Ed.). **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8th ed. New York: Mcgraw-Hill, 2001. p. 1971-1995.

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

DE LUIS ROMÁN, D. A.; IZAOLA JÁUREGUI, O. Enfermedad de jarabe de arce: una entidad rara que debemos recordar. A propósito de su manejo dietético. **An. Med. Interna**, Madrid, v. 22, n. 10, p. 493-497, 2005.

DÍAZ, V. M. et al. Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long-term follow-up. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, Philadelphia, v. 59, n. 5, p. 636-639, 2014.

FEIER, F. H. et al. Successful domino liver transplantation in maple syrup urine disease using a related living donor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 47, n. 6, p. 522-526, 2014.

FEIER, F. H. et al. Living related versus deceased donor liver transplantation for maple syrup urine disease, **Molecular Genetics and Metabolism.,** v.117 p. 336–343,2016.

FISHER, C. R. et al. Occurrence of a Tyr393----Asn (Y393N) mutation in the E1 alpha gene of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in maple syrup urine disease patients from a Mennonite population. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 49, n. 2, p. 429-434, 1991.

FLASCHKER, N. et al. Description of the mutations in 15 subjects with variant forms of maple syrup urine disease. **J. Inherit. Metab. Dis.**, Dordrecht, v. 30, n. 6, p. 903-909, 2007.

Frankenburg WK, Dodds J, Archer P, Shapiro H, Bresnick B. **DENVER II: training manual**. 2nd ed. Denver, USA: Denver Developmental Materials; 1992.

GUERREIRO, G. et al. Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple syrup urine disease: the L-carnitine role. **Int. J. Dev. Neurosci.**, Oxford, v. 42, p. 10-14, 2015.

HALLAM, P.; LILBURN, M.; LEE, P. J. A new protein substitute for adolescents and adults with maple syrup urine disease (MSUD). **J. Inherit. Metab. Dis.**, Dordrecht, v. 28, n. 5, p. 665-672, 2005.

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

HERBER, S. et al. Maple syrup urine disease in Brazil: a panorama of the last two decades. **J. Pediatr. (Rio J).**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 3, p. 292-298, 2015.

HOFFMANN, G. F.; SCHULZE, A. Organic acidurias. In: SARAFOGLOU, K. (Ed.). **Pediatric endocrinology and inborn errors of metabolism**. New York: McGraw-Hill, 2009. p. 83-118.

INSTITUTE OF MEDICAL GENETICS IN CARDIFF. The Human Gene Mutation Database. 2013. Disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Acesso em: 25 nov. 2018.

LI, X. et al. Eleven novel mutations of the BCKDHA, BCKDHB and DBT genes associated with maple syrup urine disease in the Chinese population: report on eight cases. **Eur. J. Med. Genet.**, Amsterdam, v. 58, n. 11, p. 617-623, 2015.

MARGUTTI, A. V. B. **Perfil genotípico de pacientes brasileiros com Doença da Urina do Xarope do Bordo**. 2015. 112 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

MCKUSICK, V. A. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 80, n. 4, p. 588-604, 2007.

MESCKA, C. P. et al. Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. **Gene**, Amsterdam, v. 548, n. 2, p. 294-298, 2014.

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

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

NELLIS, M. M. et al. Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression. **Mol. Genet. Metab.**, Orlando, v. 80, n. 1-2, p. 189-195, 2003.

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

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

RODRÍGUEZ-POMBO, P. et al. Mutational spectrum of maple syrup urine disease in Spain. **Hum. Mutat.**, New York, v. 27, n. 7, p. 715, 2006.

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

SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. The Mucopolysaccharidoses. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease**. v. 3. 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 3421-3452.

SERRA DALMAU, J. et al. Enfermidades de orina de jarabe arce. In: SANJURJO, P.; BALDELLOU, A. (Ed.). **Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditárias**. Madrid: Ergon, 2006. p. 367-374.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE PEDIATRIA. Sociedade Portuguesa de Neuropediatria. Tratamento do estado de mal epiléptico em idade pediátrica. **Acta Pediatr. Port.**, Lisboa, v. 38, n. 4, p. 163-168, 2007.

STENSON, P. D. et al. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. **Hum. Genet.**, Berlin, v. 133, n. 1, p. 1-9, 2014.

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

STRAUSS, K.; PUFFENBERGER, E.; MORTON, D. Maple syrup urine disease. In: ADAM, M. P. et al. (Ed.). **GeneReviews**. Seattle: University of Washington, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1319/>. Acesso em: 24 nov. 2018.

TSURUTA, M. et al. Molecular basis of intermittent maple syrup urine disease: novel mutations in the E2 gene of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. **J. Hum. Genet.**, London, v. 43, n. 2, p. 91-100, 1998.

VILLAR, J. et al. International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: The Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. **Lancet**, London, v. 384, n. 9946, p. 857-868, 2014.

WANG, Y. P. et al. Two novel mutations in the BCKDHB gene (R170H, Q346R) cause the classic form of maple syrup urine disease (MSUD). **Gene**, Amsterdam, v. 498, n. 1, p. 112-115, 2012.

WAPPER, R. S.; GIBSON, K. M. Disorders of leucina metabolism. In: BLAU, N. et al. **Physician's guide to the treatment and follow-up of metabolic diseases**. Heidelberg: Springer, 2006. p. 59-79.

WENDEL, U.; BAULNY, H. O. Branched-chain organic acidurias/acidemias. In: FERNANDES, J. et al. (Ed.). **Inborn metabolic diseases**. 4th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2006. p. 245-262.

WILSON, J. M. G.; JUNGNER, G. **Principles and practice of screening for disease**. Geneva: WHO, 1968. (Public health papers, 34). Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37650/WHO_PHP_34.pdf?sequence=17&isAllowed=y>. Acesso em: 24 nov. 2018.

YOSHINO, M. et al. Management of acute metabolic decompensation in maple syrup urine disease: a multi-center study. **Pediatr. Int.**, Carlton South, v. 41, n. 2, p. 132-137, 1999.

YOU, Y. et al. Integration of targeted sequencing and NIPT into clinical practice in a Chinese family with maple syrup urine disease. **Genet. Med.**, New York, v. 16, n. 8, p. 594-600, 2014.

ZINNANTI, W. J. et al. Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. **Brain**, Oxford, v. 132, pt. 4, p. 903-918, 2009.