**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

DIANA RUFFATO RESENDE CAMPANHOLI

Oxidação da galactose utilizando ^{13}C em crianças saudáveis e galactosêmicas

Ribeirão Preto
2014

VERSÃO CORRIGIDA

DIANA RUFFATO RESENDE CAMPANHOLI

Oxidação da galactose utilizando ^{13}C em crianças saudáveis e galactosêmicas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente.

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Prof. Dr. José Simon Camelo Junior

Ribeirão Preto
2014

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.

Catálogo da Publicação
Preparado pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Resende-Campanholi, Diana Ruffato

Oxidação da galactose utilizando ^{13}C em crianças saudáveis e galactosêmicas/ Diana Ruffato Resende Campanholi; orientador José Simon Camelo Junior. Ribeirão Preto, 2014.

73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Puericultura e Pediatria. Área de concentração: Pediatria.

1. Galactosêmicos. 2. Marcação por isótopos. 3. Oxidação. 4. Crianças.

Nome: Resende-Campanholi, Diana Ruffato

Título: Oxidação da galactose utilizando ^{13}C em crianças saudáveis e galactosêmicas

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Saúde da Criança e do Adolescente.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ao meu marido, meus pais e minha irmã provas de apoio e amor

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador José Simon Camelo Junior que é um dos maiores responsáveis pelo meu crescimento profissional desde meu segundo ano de faculdade.

Ao meu marido, Gustavo por participar tão ativamente da minha vida oferecendo não apenas compreensão e apoio mas também ótimas ideias para solucionar as dificuldades que encontrei ao longo dessa pesquisa.

Aos meus pais Sérgio e Adriana pelo apoio incondicional em todos os momentos.

À Juliana, minha querida irmã e meu cunhado Fernando por me acolherem, sempre que precisei, em sua casa com tanta alegria e disposição durante as coletas de dados em São Paulo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Ferriolli e à nutricionista Dr. Karine Pfrimer que me receberam de braços abertos no Laboratório de Espectrometria de Massa.

Aos amigos e colegas Ana Vitória e Daniel Fantozzique me auxiliaram imensamente na parte de biologia molecular.

À Dr. Gilda Porta por permitir de forma muito solícita minha coleta no Instituto da Criança de São Paulo.

Aos professores DrLuisAntonio Del Ciampo e Dr Ivan Savioli Ferraz por abrirem as portas do ambulatório de Puericultura e Pediatria.

À técnica de enfermagem Soninha que me auxiliou na seleção de alguns pacientes.

À equipe do gerenciamento de projetos, Michele e Sílvio por terem feito todas as prestações de contas de produtos adquiridos para a pesquisa dentro e fora do Brasil.

À Cláudia Haddad pela sua enorme compreensão e incentivo.

Ao Davi Casale Aragon por ter feito a análise estatística de todos os meus resultados.

RESUMO

Resende-Campanholi DR. Oxidação da galactose utilizando ^{13}C em crianças saudáveis e galactosêmicas [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2014. 73 f.

A Galactosemia é um erro inato do metabolismo da galactose que ocorre em consequência da deficiência de uma das três principais enzimas envolvidas em seu metabolismo. O tratamento da doença se faz por meio de intervenção dietética. Com a necessidade de melhorar nosso conhecimento acerca do metabolismo da galactose, isótopos estáveis estão sendo usados para mostrar o perfil de oxidação da mesma. O parâmetro bioquímico claramente correlacionado com os resultados clínicos e com o genótipo da GALT é o da oxidação da galactose em dióxido de carbono. A capacidade de determinar a oxidação com administração oral ou endovenosa de isótopos marcados ($1\text{-}^{13}\text{C}$ -galactose) de galactose fez deste um meio prático de se determinar a oxidação da galactose. Os objetivos do trabalho foram: 1. Avaliar a capacidade de oxidação de galactose em crianças brasileiras com o diagnóstico de galactosemia. 2. Avaliar a capacidade de oxidação da galactose em crianças brasileiras saudáveis. 3. Verificar a possibilidade de definir um ponto de corte para a detecção da galactosemia através do teste respiratório com a construção de uma curva ROC de maior sensibilidade e especificidade. A metodologia empregada foi a seguinte: *Amostragem*: 21 crianças saudáveis e 7 crianças com galactosemia com idade variando de 1 a 7 anos. *Teste Respiratório*: O teste respiratório de todas as crianças foi quantitativo para o enriquecimento de $^{13}\text{CO}_2$ em ar expirado antes e depois da administração oral de 7mg/kg de uma solução aquosa de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Galactose. As amostras foram colhidas antes da administração da solução e 30, 60 e 120 min após. *Mensuração do $^{13}\text{CO}_2$ no ar*: Em cada amostra de ar duplicada a razão molar do $^{13}\text{CO}_2$ e $^{12}\text{CO}_2$ foi quantificado pela razão de massa/carga (m/z) dos isótopos gasosos através de um espectrômetro de massa. *Análise estatística*: Construção de uma curva ROC para determinar o melhor ponto de corte das diferenças em porcentagem da $1\text{-}^{13}\text{C}$ -galactose recuperada em $^{13}\text{CO}_2$ que forneça um teste respiratório “positivo” para detecção da galactosemia de maior sensibilidade e especificidade. As crianças doentes tiveram uma % acumulativa de ^{13}C no ar expirado proveniente da galactose marcada (CUMPCD) variando em média de 0,03% no tempo de 30 minutos a 1,67% no tempo de 120 minutos. Em contrapartida, os indivíduos saudáveis apresentaram enriquecimentos e uma CUMPCD maiores, com valores de 0,4% no tempo de 30 minutos a 5,58% no tempo 120 minutos. Portanto, nesse estudo ficou evidente que há uma diferença marcante na oxidação da galactose em crianças com e sem galactosemia, logo teste respiratório é útil em discriminar crianças com deficiência na GALT.

Palavras-Chave: Galactosêmicas. Marcação por isótopos. Oxidação. Criança.

ABSTRACT

Resende-Campanholi DR. Galactose oxidation using ^{13}C in healthy and galactosemic children [dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Medicine of Ribeirão Preto, 2014. 73f.

Galactosemia is an inborn error of galactose metabolism that occurs as an outcome of an enzyme deficiency. The current treatment is based on dietary intervention. Stable isotopes have been used to assess galactose's oxidation profile due to an urgency to improve our knowledge on its metabolism. The biochemical parameter clearly correlated to clinical outcomes and to GALT genotype is the galactose oxidation process into carbon dioxide. The ability to assess galactose's oxidation after galactose labeled isotope administration ($1\text{-}^{13}\text{C}$ -galactose) has become a practical way of determining the metabolism of galactose. The aims of the study were: 1 Assess the galactose oxidation ability in Brazilian galactosemic children. 2 Assess the galactose oxidation ability in healthy Brazilian children. 3 Set a cut off point for detecting galactosemia through breath test by constructing a ROC curve. The methodology employed was: *Sampling*: 21 healthy children and 7 children with galactosemia with age ranging from 1 to 7 years. *Breath test*: the breath test of all the children was quantitative for $^{13}\text{CO}_2$ enrichment in exhaled air before and after oral administration of 7mg/kg of $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Galactose aqueous solution. Samples were collected at baseline time, 30, 60 and 120 min after solution administration. *Measurement of the $^{13}\text{CO}_2$ in the air*: molar ratio $^{13}\text{CO}_2$ and $^{12}\text{CO}_2$ were quantified by the mass/charge ratio (m/z) of stable isotopes through a mass spectrometer in every air sample. *Statistical analysis*: ROC curve construction in order to determine the best cutting point of differences in percentage of $1\text{-}^{13}\text{C}$ -galactose recovered in $^{13}\text{CO}_2$ that provides a positive breath test for galactosemia detection. Therefore, as a result, sick children had some percentage of cumulative ^{13}C in the exhaled air from labeled galactose (CUMPCD) ranging from 0.03% in 30 minutes time to 1.67% in 120 minutes. In contrast, healthy subjects showed a CUMPCD much more expressive, with values ranging from 0.4% in 30 minutes to 5.58% in 120 minutes. Therefore, in this study has shown that there is a great difference in galactose oxidation in children with and without galactosemia, hence the breath test is useful in discriminating children with GALT deficiencies.

Keywords: Galactosemias. Isotopes labeling. Oxidation. Child.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Metabolismo de carboidratos do organismo humano. GALT: galactose-1-fosfato- uridil-transferase. GALK: galactokinase. EPIMERASE: uridina-difosfato-galactose-4- epimerase. Gal-1-P: galactose-1-fosfato. Fru-6-P: frutose-6-fosfato. Fru-1,6-bis-P: frutose 1,6 difosfato. Glc-1-P: glicose-1-fosfato. UDP-gal: uridina-difosfato-galactose. UDP-glc: uridina- difosfato-glicose. Glc-6-P'ase: glicose-6-fosfatase. T: transportador.....	16
Figura 2 -	Metabolismo de carboidratos do organismo humano. Fru-1-P: frutose-1-fosfato. Fru-6-P: frutose-6-fosfato. Fru-1,6-bis-P: frutose 1,6 difosfato. Diidroxí-acetona-P: diidroxí- acetona-fosfato. Gliceraldeído-P: gliceraldeído-fosfato. Glicerol-3-P: glicerol-3-fosfato. LDH: desidrogenase láctica. PEPCK: fosfo-enol-piruvato-carboxi-kinase. T: transportador. PC: piruvato-carboxilase. PDH: piruvato-desidrogenase. Ciclo TCA: ciclo dos ácidos tricarboxílicos. AA: aminoácidos	17
Figura 3 -	Diagrama da Via de Leloir e da via da UDP-glicose pirofosforilase. Metabolismo da galactose. *Lactase. **Aldose-redutase. #Galactose-desidrogenase. Galk: galactokinase. Galt: galactose-1-fosfato-uridiltransferase. Gale: uridina-difosfato-galactose-4-epimerase. ATP: adenosina-trifosfato. ADP: adenosina-difosfato. UDP-glicose: uridina-difostato-glicose. Glicose-1-P: glicose-1-fosfato. Hex: hexoquinase. Pgm: fosfato-glicose-mutaseUgp: uridina-difosfato-glicose-fosforilase.....	19
Figura 4 -	Conversão da 1- ¹³ C-Galactose em ¹³ C-Glicose e ¹³ CO ₂	22
Figura 5 -	Diferença percentual acumulativa da ingestão de 1- ¹³ C-galactose recuperada em ¹³ CO ₂	23
Figura 6 -	Esquema de funcionamento de um espectrômetro de massa.....	26
Figura 7 -	Cálculo da quantidade de ¹³ C presente em uma amostra.....	28
Figura 8 -	Integração das doses percentuais de ¹³ CO ₂ recuperadas em cada tempo pelo método trapezoidal.....	37
Figura 9 -	Boxplots das variáveis de interesse, de acordo com grupo e tempo: enriquecimento do CO ₂ com ¹³ C.....	44
Figura 10 -	Boxplots das variáveis de interesse, de acordo com grupo e tempo: % cumulativa de ¹³ CO ₂ proveniente da galactose marcada com ¹³ C.....	45
Figura 11 -	Curva ROC – Tempo 30 min.....	46

Figura 12 -	Curva ROC – Tempo 60 min.....	46
Figura 13 -	Curva ROC – Tempo 120 min.....	47
Figura 14 -	Galactose e o pool de galactose que ocorre proveniente da dieta e da produção endógena a partir do turnover de glicoproteínas, carboidratos complexos e lipídeos. A metabolização e excreção por diversas vias: (1) excreção urinária de galactitol e produtos do metabolism formados pela aldolredutase, (2) a formação de galactonatos por meio da galactose dehydrogenase e sua excreção urinária, (3) a oxidação em CO ₂ por metabolism do galactonato, a formação de galactose – 1 – P e sua subsequente disposição por meios da GALT residual a UDP glucose pirofosforilase e por último a CO ₂ , (4) a possibilidade de um caminho desconhecido.....	52
Figura 15 -	Construção de uma curva ROC	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características antropométricas das crianças com galactosemia.....	40
Tabela 2 -	Características gênicas, atividade de enzima e %enriquecimento do CO ₂ com ¹³ C em 120min em crianças com galactosemia	41
Tabela 3 -	Características antropométricas dos indivíduos sem galactosemia	42
Tabela 4 -	Características das crianças sem galactosemia	43
Tabela 5 -	Descrição das variáveis, de acordo com grupo e tempo	44
Tabela 6 -	Resultado da comparação entre os grupos nos diversos tempos feitos em modelo linear de efeitos mistos.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Teor de Galactose nos alimentos 21

Quadro 2 - Equações Utilizadas Para o Cálculo da Produção de CO₂..... 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácidos
ADP	Adenosina-difosfato
AP	Fosfatase alcalina
ATP	Adenosina-trifosfato
Ciclo TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
Diidroxí-acetona-P	Diidroxí-acetona-fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EIM	Errosinatos do metabolismo
EPIMERASE	Uridina-difosfato-galactose-4-epimerase
Fru-1-P	Frutose-1-fosfato
Fru-6-P	Frutose-6-fosfato
GALK	Galactokinase
GALT	Galactose-1-fosfato-uridil-transferase
Gal-1-P	Galactose-1-fosfato
GAO	Galactose oxidase
GHD	D-galacto-hexadialdose
Glc-1-P	Glicose-1-fosfato
Glc-6-P'ase	Glicose-6-fosfatase
Gliceraldeído-P	Gliceraldeído-fosfato
Glicerol-3-P	Glicerol-3-fosfato
GT	Galactose total
HC-FMRP-USP	Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP
Hex	Hexoquinase
LDH	Desidrogenase láctica
μmol/h/gHb	Micro-moles por hora por grama de hemoglobina
mg/dL	Miligrama por decilitro
NADP	Nicotinamida-adenina-difosfato
PEPCK	Fosfo-enol-piruvato-carboxi-kinase
PC	Piruvato-carboxilase
PDH	Piruvato-desidrogenase
Pgm	Fosfato-glicose-mutase
POD	Peroxidase
UDP-gal	Uridina-difosfato-galactose
UDP-glc	Uridina-difosfato-glicose
UDPG	Uridina-difosfo-glicerato
Ugp	Uridina-difosfato-glicose-fosforilase
UTP	Uridina-trifosfato
SNC	Sistema nervoso central
PCD	Dose percentual
CUMPCD	Quantidade acumulativa da dose percentual

PDB	<i>PeeDee Belemnite</i>
ROC	<i>Receiver operator curve</i>
GEB	Gastoenergético basal
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
m/z	Razão massa/carga
AUC	Área sobre a curva
OMS	Organização Mundial da Saúde
IMC	Índice de massa corporal
Σ	Somatório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O Carboidrato Galactose	17
1.2 Os Erros Inatos do Metabolismo	18
1.3 Galactosemia: Um Erro Inato no Metabolismo da Galactose	19
1.4 Isótopos Estáveis e a Espectrometria de Massa.....	26
1.5 Isótopos Estáveis e Segurança	28
2 HIPÓTESE.....	30
3 OBJETIVOS	32
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 População de Estudo.....	35
4.2 Teste Respiratório.....	35
4.3 Mensuração do $^{13}\text{CO}_2$ no Ar.....	36
4.4 Análise Estatística	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Características da Amostragem	40
5.2 Perfil de Enriquecimento do CO_2 e % Acumulativa de $^{13}\text{CO}_2$ Recuperado Proveniente da Galactose Marcada.....	43
5.3 Construção da Curva ROC	45
5.4 CUMPCD nos Diferentes Tempos e Entre os Grupos com Galactosemia e sem Galactosemia	47
6 DISCUSSÃO	49
6.1 O Uso de Fórmulas Preditivas em Detrimento da Calorimetria Indireta	50
6.2 Oxidação da Galactose em Crianças com Galactosemia e Sem a Doença.....	50
6.3 Curva ROC	53
6.4 Detecção da Galactosemia e o Teste Respiratório.....	54
6.5 Expressão Fenotípica e o Teste Respiratório.....	55
7 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	59
ANEXO.....	64

e, principalmente, para a prevenção por aconselhamento genético ou detecção precoce em outros membros da família.

Os EIM ou defeitos metabólicos herdados podem ocorrer: em transporte de membrana, em diminuição de atividade enzimática com acúmulo de substrato, em desvio metabólico com a produção de substâncias pouco comuns no organismo, a partir de acúmulo de alguns substratos, na ausência ou inatividade de apoenzimas ou cofatores do metabolismo, na falta de retro-alimentação negativa da ação enzimática e na atuação de produtos anômalos do metabolismo em passos metabólicos enzimáticos à distância do passo originalmente alterado.

O processo fisiopatológico do acúmulo de substrato envolve a inatividade de enzimas mutantes responsáveis pela degradação de lipídios complexos hidrofóbicos ou de metabólitos geralmente hidrossolúveis, provenientes do metabolismo intermediário de carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos, que se reflete em rápidos acúmulos desses produtos em plasma e urina.

Em termos causais, EIM são herdados. A grande maioria das doenças metabólicas, dentre elas a galactosemia, envolve herança Mendeliana. São autossômicas recessivas, com a doença se expressando em homozigotos, com duas mutações nem sempre iguais no mesmo gene, o que torna importante a ocorrência de consanguinidade (Hughes et al., 2009).

1.3 Galactosemia: Um Erro Inato no Metabolismo da Galactose

A Galactosemia é um erro inato do metabolismo da galactose que ocorre em consequência da deficiência de uma das três principais enzimas envolvidas no metabolismo da galactose, são elas GALK (galactokinase), GALT (galactose- 1- fosfato-uridiltransferase) e GALE (uridina - difosfato-galactose - 4 -epimerase)(Schweitzer,2003).A galactosemia clássica, forma predominante, é secundária à redução grave ou ausência da enzima GALT, acarretando o acúmulo de galactose que, por sua vez, pode causar o aumento na produção de substâncias normalmente encontradas em menor quantidade no organismo, como o galactitol e galactonato, tóxicos para o organismo e reais causadores das consequências fisiopatológicas da doença galactosemia, provavelmente associados a níveis elevados de galactose-1-P (Bosch, 2006; Jongh et al., 2008).A Figura 3 mostra a via de metabolismo da galactose.

Figura 3 – Diagrama da Via de Leloir e da via da UDP-glicose pirofosforilase. Metabolismo da galactose. *Lactase. **Aldose-redutase. #Galactose-desidrogenase. Galk: galactokinase. Galt: galactose-1-fosfato-uridiltransferase. Gale: uridina-difosfato- galactose-4-epimerase. ATP: adenosina-trifosfato. ADP: adenosina-difosfato. UDP-glicose: uridina-difostato-glicose. Glicose-1-P: glicose-1-fosfato. Hex: hexoquinase. Pgm: fosfato- glicose-mutase Ugp: uridina-difosfato-glicose-fosforilase

A GALT é essencial para a produção de glicose-1-fosfato (glicose-1-P) a partir da galactose, via galactose-1-fosfato (galactose-1-P) e uridina-difosfato-galactose (UDP-gal). Essa via é particularmente importante no lactente, cuja fonte principal de carboidratos é a lactose. A GALT também parece ser necessária na produção ótima de UDP-gal, o co-fator para a incorporação da galactose nos galactosídeos. A deficiência de GALT leva a três importantes perturbações metabólicas. Primeiro as concentrações elevadas de galactitol são formadas a partir da galactose e acumuladas no plasma, urina, cérebro e músculos de pacientes galactosêmicos e níveis moderados no cristalino; ainda que concentrações de galactitol em plasma e urina apresentem redução em pacientes galactosêmicos com dietas restritas em galactose, esses níveis permanecem acima do normal. A segunda anormalidade metabólica é o grande acúmulo de galactose-1-P em tecidos e eritrócitos, que declinam nas dietas restritas em galactose, mas permanecem também acima do normal (“auto-intoxicação” por síntese endógena de galactose-1-P a partir de glicose-1-P e pequenas quantidades de galactose que permanecem na dieta, liberadas a partir do turnover de glicoproteínas). A anormalidade metabólica final e mais recentemente identificada é a baixa concentração de UDP-gal demonstrada em eritrócitos, culturas de fibroblastos de pele e fígado de pacientes galactosêmicos (Holton et al., 2001).

As principais manifestações clínicas geralmente iniciam-se no período neonatal, com risco frequente de vida do recém – nascido: falha de crescimento, vômitos, diarreia, icterícia, disfunção hepática ou hepatomegalia e anemia hemolítica grave. A doença hepática pode progredir com cirrose e insuficiência hepática grave, ascite, cataratas, sinais de hipertensão intracraniana e edema cerebral, além de letargia, hipotonia e retardo mental(Kaufman et al.,1995; Schweitzer-Krantz,2003; Bosch et al.,2004).É alta a frequência de sepse por *E. coli*. A maioria das crianças afetadas desenvolve complicações em longo prazo, incluindo retardo mental, deficiências na fala e insuficiência ovariana (Nelson,1995;Shield et al.,2000; Schweitzer-Krantz,2003).

A ocorrência da galactosemia clássica varia com a origem étnica da população, sendo que em Caucasianos na Europa e América do Norte a incidência está entre 1:30.000 e 1:60.000 recém-nascidos (Clague; Thomas, 2002). Na África do Sul, a incidência é estimada em 1:14.400, na população negra(Henderson et al., 2002).Entre asiáticos, a incidência é muito menor, tendo sido descrita frequência inferior a 1:100.000 nascidos vivos em um estudo realizado nas Filipinas (Padilla et al., 2003).

No Brasil, cuja população é largamente miscigenada, um estudo em uma amostra de 60.000 recém-nascidos do estado de São Paulo demonstrou uma incidência para a galactosemia de 1:19.984 nascidos vivos com um intervalo de confiança que varia de 1:12.015 a 1:59.365 neonatos (Camelo et al., 2009).

O tratamento da doença se faz por meio de intervenção dietética. Quando houver suspeita clínica de galactosemia, ou em casos assintomáticos com triagem neonatal positiva, a lactose deve ser removida da dieta mesmo antes da confirmação bioquímica do diagnóstico. Como a lactose é precursora da galactose, o leite e seus derivados, incluindo o leite humano, bem como os alimentos e medicamentos que contenham lactose, são estritamente proibidos(Quadro 1).

Grupo Alimentar	< de 5g de GAL por 100g de alimento	De 5 a 20g de GAL por 100g de alimento	>de 20g de GAL por 100g de alimento
Pães e cereais sem leite	Nenhum	Nenhum	Biscoitos, <i>muffins</i> , panquecas, <i>waffles</i> que contenham leite, cereais com leite
Queijos e produtos com leite	Nenhum	Nenhum	Todos os tipos de queijo, iogurte, nata, lactoalbumina, creme de leite, queijos de soja com caseinato de cálcio ou sódio
Doces	Bolos, <i>cookies</i> e pudins SEM LEITE, gelatina, sorvetes e tortas SEM LEITE preparado com água ou proteína isolada de soja e sorvetes de frutas preparadas com as frutas permitidas		Qualquer doce com chocolate ou leite, sorvetes com leite, sobremesa com caqui, mamão ou melancia, sobremesas preparadas com manteiga ou margarina.
Ovos	Todos	Nenhum	Omeletes, suflês e outras preparações com leite
Gorduras	Gordura animal, bacon, margarina sem leite, maionese sem leite, óleos vegetais, azeitonas	Nenhum	Cremes e creme de leite
Frutas e Sucos	Abacate, manga, nectarina, melão, laranja	Maçãs, banana, uva verde, kiwi, pêssego, melão, melancia, pêra, abacaxi, morango.	Figo, outras uvas, limão, laranja lima, mamão, caqui.
Grãos	Arroz, milho, macarrão sem leite, trigo	Nenhum	Todos os produtos industrializados que contenha grãos misturados com leite
Oleaginosas	Castanhas, amendoim, manteiga de amendoim SEM LEITE	Todos os tipos de feijão e vagem	Nenhum
Vegetais	Aspargo, broto de bambu, beterraba, repolho, couve-flor, salsão, milho, pepino, alface, folha de mostarda, rabanete, batata, espinafre, abobrinha	Brócolis, cenoura, berinjela, cebola, abóbora, batata – doce, nabo	Tomate cru
Ingredientes	Lactato, ácido láctico, glutamato monossódico, goma guar	Nenhum	Alimentos dietéticos com leite, medicações com galactose.

Quadro 1 – Teor de Galactose nos alimentos

Fonte: Adaptado do material do *Ross Metabolic Formula System*

Infelizmente, com o tempo, apesar da restrição alimentar na ingestão de galactose, alguns pacientes com deficiência de GALT apresentam aumentos persistentes na concentração eritrocitária de galactose-1-fosfato e na excreção de galactitol urinário (Berry et al., 1993). A razão para o fracasso da dietoterapia no controle dos danos clínicos e bioquímicos a longo prazo é desconhecido. Gitzelmann et al. (1969) sugerem que a produção endógena de galactose, independente da dieta, é o mecanismo por trás de tal fato, produzindo um estado crônico de “autointoxicação”. Um outro ponto que vem sendo estudado são os genes modificadores de doença para explicar diferentes respostas clínicas ao tratamento. Lo et al. (2012) encontraram resultados importantes; em sua pesquisa ficou evidente que genes modificadores podem delimitar a grande variedade de fenótipos na doença de Gaucher tipo 1; assim, os autores afirmaram que o estudo de genes modificadores para a doença de Gaucher pode facilitar o tratamento personalizado de cada indivíduo e esclarecer os mecanismos fisiopatológicos da doença.

Dessa forma, com a necessidade de melhorar nosso conhecimento acerca do metabolismo da galactose, isótopos estáveis estão sendo usados para mostrar o perfil de oxidação da mesma.

O parâmetro bioquímico claramente correlacionado com os resultados clínicos e com o genótipo da GALT é o da oxidação da galactose em dióxido de carbono. A capacidade de determinar a oxidação com administração oral ou endovenosa de isótopos marcados ($1\text{-}^{13}\text{C}$ -galactose) de galactose fez deste um meio prático de se determinar a oxidação da galactose.

Usando métodos de rastreamento de isótopos mostrou-se que pacientes com galactosemia, assim como homens saudáveis sintetizam galactose em certa dose diária e pacientes com o genótipo mais grave da doença tem uma capacidade bem reduzida de manejar tal dose de galactose, o que é mostrado na Figura 4 pela conversão da $1\text{-}^{13}\text{C}$ -galactose em ^{13}C -Glicose e $^{13}\text{CO}_2$ (Berry et al., 1997).

Figura4 - Conversão da 1-¹³C-Galactose em ¹³C-Glicose e ¹³CO₂

Alguns estudos mostraram que após a administração endovenosa de 1-7mg/kg de solução de galactose, pacientes homo ou heteroalélicos para a mutação Q188R (genótipo clássico) eliminaram para menos de 0,31 e 3,5% de ¹³CO₂ no ar expirado após 1 e 5h respectivamente. Em contrapartida, indivíduos controles eliminaram 3 a 6% e 21 a 47% em 1 a 5 h respectivamente.

O teste respiratório que avalia a capacidade de oxidação corporal da galactose em algumas horas não é capaz de deduzir os resultados clínicos para todos os genótipos. Ele poderia ser mais útil em estabelecer as doenças similares ao genótipo clássico (Berry et al.,1997). Além disso, o teste respiratório com a galactose marcada pelo ¹³C é um teste seguro para crianças normais e galactosêmicas e oferece uma avaliação precisa e rápida da oxidação da galactose corporal. Nem a Galactose -1-fosfato e nem o galactitol urinário aumentaram 24horas após a administração oral de 7mg/kg de 1-¹³C-galactose (Barbouth et al.,2007). Este teste tem um alto valor preditivo para dispraxia e insuficiência ovariana em pacientes galactosêmicos mais velhos(Barbouth et al., 2007).

Berryet al. (2000)demonstraram não haver mudança significativa na diferença percentual da1-¹³C-galactose recuperada em ¹³CO₂utilizando administração oral ou endovenosa do composto (Figura 5).

Figura 5 – Diferença percentual acumulativa da ingestão de 1-¹³C-galactose recuperada em ¹³CO₂
Fonte: Berry et al. (2000)

Para melhor entendimento sobre a utilização da galactose marcada com carbono 13 devemos compreender o que são e como são dosados os isótopos estáveis.

1.4 Isótopos Estáveis e a Espectrometria de Massa

Isótopos são átomos de um elemento químico cujos núcleos têm o mesmo número atômico (número de prótons), mas diferentes massas atômicas (resultado do somatório de prótons e nêutrons). A palavra isótopo, que significa no mesmo sítio, vem do fato de que esses elementos situam-se no mesmo local na tabela periódica. Os isótopos de um certo elemento contêm o mesmo número de prótons. A diferença nos pesos atômicos resulta de diferenças no número de nêutrons nos núcleos.

Por meio de técnicas analíticas modernas, como a espectrometria de massa, substâncias marcadas com isótopos podem ser mensuradas intactas ou mesmo após sua conversão em seus metabólitos. Vários isótopos são utilizados em pesquisas, em especial os isótopos de hidrogênio, oxigênio e de carbono (Gregg, 1974).

A espectrometria de massa (EM) é uma técnica largamente utilizada pelos químicos na análise de moléculas de diversas massas molares (μg - pg).

A grande sensibilidade do método faz com que seja rotineiramente usado na análise de substâncias em baixa concentração, como no caso do doping, controle de alimentos e medicamentos, contaminação ambiental, entre muitas outras aplicações.

As etapas envolvidas no processo de análise por meio da espectrometria de massa envolvem :

- Bombardeamento das moléculas por um feixe de elétrons de alta energia
- Aceleração dos íons em um campo elétrico e magnético e separação pela razão massa/carga
- Detecção dos íons com determinada razão massa/carga

Imediatamente após a ionização da amostra, as moléculas ionizadas e no estado gasoso (ou plasma) entram no setor de análise do espectrômetro de massa. Neste, os diferentes íons gerados na câmara de ionização (íon molecular + fragmentos) serão separados de acordo com sua razão massa/carga (m/z). O setor de análise é que determina a acurácia do aparelho e em qual faixa de intervalo de massa os compostos podem ser analisados.

A ionização de moléculas por impacto eletrônico é o método mais comumente usado e mais desenvolvido em IRMS. A fonte de íons consiste, geralmente, de um filamento de **renium**, **irídio** ou **tungstênio** que se aquece quando submetido a uma diferença de potencial e

por ele passa uma corrente elétrica, emitindo elétrons (emissão termoiônica). Os elétrons emitidos pelo filamento são acelerados à energias da ordem de 80 eV (variável em função do gás a ser ionizado). Após o gás atravessar a passagem (“leak”), que liga o reservatório de amostra à câmara de ionização, as moléculas neutras chegam em uma câmara que é mantida a pressão de 10^{-4} a 10^{-7} torr (mm Hg) e temperatura de aproximadamente 200°C. Perpendicularmente ao fluxo de gás na entrada da câmara, o feixe de elétrons irá bombardear os átomos ou moléculas das amostras que são assim ionizadas. Contudo, as fontes de ionização por impacto de elétrons são simples, estáveis e confiáveis (Azevedo, 2004)

Sistema acelerador de íons

Os íons positivos formados na câmara de ionização são dirigidos ao campo eletrostático formado por placas aceleradoras de carga negativa, sendo repelidos da câmara de ionização pela placa positiva. O forte campo eletrostático entre a primeira e a segunda placa aceleradora (“firstandsecondacceleratingslit”) por exemplo de 400 – 4000 V, acelera os íons de diferentes massas ($m_1, m_2, \dots, m_n$) à suas velocidades finais (Azevedo, 2004).

Sistema analisador magnético de íons

O analisador magnético de íons tem por base de funcionamento o princípio da ação da força exercida sobre os íons que penetram um campo magnético H , perpendicular à direção do seu movimento. O raio de curvatura da trajetória descrita pelo feixe de íons no analisador é função da relação m/q , da sua energia e da intensidade do campo magnético.

Portanto, é possível focalizar um feixe de íons de número de massa A em um coletor, tanto pela variação da intensidade do campo magnético (H) como pela variação da tensão de aceleração dos íons (V).

Em instrumentos destinados à análises de elementos leves (H, C, N, O, e S) os campos magnéticos são criados por ímãs permanentes, tendo, portanto, H fixo. Isso simplifica a construção do aparelho e aumenta a estabilidade do feixe de íons, pois elimina uma das fontes de flutuação. A varredura (“scanning”) das massas é feita neste caso pela variação da tensão de aceleração dos íons (V). Os valores típicos de V podem variar de 2.000 a 5.000 V.

Um instrumento de setor magnético simples é aquele em que o feixe entra e sai do campo magnético num ângulo de 90° com o plano das faces dos pólos do magneto, sendo conhecido como analisador simétrico. No analisador assimétrico, por conseguinte, o feixe de

íons faz um ângulo menor que 90° com o plano das faces dos pólos do magneto. A maioria dos IRMS antigos empregavam geometria simétrica. Os IRMS modernos empregam a geometria assimétrica que possibilita o aumento da dispersão sem necessidade de se aumentar o raio (Azevedo, 2004).

Coletor de íons

O feixe de íons produzido na fonte de íons é separado no analisador magnético em tantos feixes de íons de número de massa A_i , quantos forem as espécies isotópicas da amostra. Os feixes de íons das diferentes espécies isotópicas, após serem discriminados são direcionados para o coletor de íons, um por vez, no caso de um MS com coletor simples, pela variação da indução magnética do eletroímã. A intensidade de corrente gerada em uma resistência R é proporcional à concentração da espécie isotópica. Essa corrente, circulando através de R , produz uma diferença de potencial que após a sua amplificação pode acionar um registrador ou ser digitalizado.

Entre os tipos de coletores de íons os mais utilizados para análises da composição isotópica de elementos leves são do tipo copo de Faraday (“Faraday cup”). A geometria desses coletores é projetada para minimizar os efeitos de elétrons secundários emitidos pelo impacto dos íons nas paredes internas do tubo analisador e do próprio coletor.

Os instrumentos destinados para determinações precisas de razões isotópicas R são construídos com dois ou três coletores, existindo MS com cinco coletores, de modo que sejam coletados simultaneamente os feixes de íons das espécies isotópicas de interesse. Como exemplo, para análise da razão isotópica de nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) com triplo coletor, tem-se a medida simultânea da intensidade das massas 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$), 29 ($^{15}\text{N}^{14}\text{N}$) e 30 ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$), podendo-se chegar as razões I_{29}/I_{28} e I_{30}/I_{28} . No caso de sistema com dois coletores, tem-se o coletor do tipo copo-placa (“cup-plate”) e o copo-copo (“cup-cup”). No primeiro caso (“cup-plate”) o coletor ou a fenda recebe o feixe de íons da espécie mais abundante (28, por exemplo), juntamente com outras cuja massa esteja muito próxima à espécie, e a placa recebe o feixe ou feixes menos abundante (29, como exemplo em uma análise de nitrogênio).

Os IRMS modernos cobrem a faixa de escala de número de massa (m/q) de 2-100, sendo projetados para detectar feixes de íons que produzem correntes elétricas de 10^{-11} a 10^{-8} A. As amostras são gases simples como H_2 , CO_2 , N_2 e SO_2 , requerendo baixo poder de resolução ($m/\Delta m < 100$). Por outro lado, espectrômetros de massas para análise de orgânicos requerem um poder de resolução maior, a fim de separar feixes de íons muito próximos e de

massas com $m/q > 500$ e que produzem corrente elétrica no coletor menor que 10^{-12} A (Azevedo, 2004).

Mensuração do $^{13}\text{CO}_2$ por meio do espectrômetro de massa

O dióxido de carbono possui três massas diferentes, dependendo do isótopo que o compõe. O CO_2 , na sua forma mais comumente encontrada, é constituído de um átomo de ^{12}C e dois átomos de ^{16}O , possui massa molecular de 44, enquanto que o CO_2 contendo o ^{13}C no lugar do ^{12}C possui massa molecular 45. Já o CO_2 formado com um átomo de ^{18}O possui massa atômica de 46, mas essa é uma forma muito rara, por isso geralmente não é mensurada.

Assim, após ionizar a o dióxido de carbono, o espectrômetro através de um campo magnético, separa os carbonos de diferentes massas atômicas, fornecendo, dessa forma, a quantidade de cada isótopo na amostra (Figura 6).

Figura 6 – Esquema de funcionamento de um espectrômetro de massa

O cálculo da quantidade de carbono marcado com o isótopo ^{13}C na amostra se faz por meio de uma razão massa/carga em relação a um padrão. O padrão utilizado para o carbono-13 foi o *PeeDeeBelemnite* (PDB). Esse padrão foi baseado em um fóssil marinho da era Cretácea, *Belemnitella americana*, presente na formação rochosa *PeeDee*, localizada na Carolina do Sul, Estados Unidos da América. Tal material possui uma razão $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ extremamente alta (0.0112372) por isso foi considerada o valor padrão para os cálculos envolvendo ^{13}C . (Demmelmaier et al., 1995; Demmelmaier et al., 1997).

O resultado da quantidade de carbono marcada é dado em partes por mil e a nomenclatura utilizada o delta PDB (ΔPDB) (Figura 7).

$$\Delta^{13}\text{C} = \left(\frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{Amostra}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{Padrão}}} - 1 \right) \times 1000 \text{‰}$$

Figura 7 – Cálculo da quantidade de ^{13}C presente em uma amostra

1.5 Isótopos Estáveis e Segurança

Isótopos estáveis de um elemento não possuem propriedades radioativas, por isso são chamados estáveis. Eles diferem em suas características físicas, químicas e bioquímicas devido a sua diferença de massa, a qual pode causar efeitos térmicos e cinéticos isotópicos. Tais efeitos ocorrem espontaneamente ou em reações catalisadas por enzimas. Um efeito isotópico pode ser quantificado pela razão da taxa de reação do isótopo mais leve em relação ao mais pesado. Baseando em considerações teóricas, esta razão pode atingir um valor máximo de 18 para hidrogênio/deutério, mas apenas de 1,25 para $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ por causa da menor diferença em porcentagem de massa entre os isótopos de carbono em relação aos isótopos de hidrogênio (Krumbiegel, 1991). Por isso a quebra entre ligações com o deutério pode ser até 18 vezes mais lenta do que com o hidrogênio.

Embora seja possível a ocorrência de pequenas diferenças no comportamento metabólico, moléculas marcadas com isótopos estáveis em uma ou mais posições são substâncias muito apropriadas e podem ser administradas via oral ou intravenosa para o estudo *in vivo* de processos biológicos e químicos (Koletzko et al., 1995).

Em contraste com o hidrogênio e com o deutério, a diferença relativa de massa entre ^{12}C e ^{13}C é pequena e as características físico-químicas dos dois isótopos são praticamente iguais, por isso a probabilidade de efeitos clínicos adversos causados pela administração do ^{13}C é muito baixa (Koletzko et al., 1998).

Para avaliar a segurança do ^{13}C , Gregget al. (1973) administrou quantidades excessivas em relação à dosagem usual de ^{13}C em ratos e foi alcançado um enriquecimento do ^{13}C maior que 60% em alguns animais após um período alimentar de mais de 200 dias sem nenhum efeito colateral. Em estudos com marcadores em humanos, a dosagem mínima foi de 1mg/kg de ^{13}C e raramente excedeu 25mg/kg, enquanto que a quantidade natural presente no corpo de ^{13}C é por volta de 2000mg/kg de peso corporal; além disso, estudos com marcadores não induziram mudanças significativas na composição natural de ^{13}C corporal (Koletzko et al., 1997).

Grande número de aplicações de métodos usando isótopos estáveis é usado em pesquisas pediátricas e em diagnósticos. O princípio do teste é a aplicação de uma quantidade definida do componente a ser estudado marcado com ^{13}C e a mensuração do aparecimento do marcador no produto metabólico final determinado pela razão $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ no CO_2 exalado. Em combinação com a mensuração da produção total de CO_2 por calorimetria indireta, ou por cálculos com fórmulas pré-definidas de gasto energético basal, a proporção do marcador oxidado pode ser calculado e a integração dos resultados pelo tempo revela a porcentagem do composto marcado que foi oxidado.

Dessa forma, utilizando o isótopo estável de ^{13}C como marcador, este estudo visa mapear pela primeira vez em uma amostra brasileira o perfil de oxidação da galactose em crianças saudáveis e em crianças com deficiência na atividade da enzima GALT acompanhados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e no Instituto da Criança de São Paulo, ambos em parceria com a Universidade de São Paulo, para definir um ponto de corte para a detecção da galactosemia pelo teste respiratório.

As crianças brasileiras com galactosemia possuem um perfil de oxidação da galactose menor do que as crianças sem galactosemia. Esse perfil de oxidação pode ser diferente de outros países devido a existência de perfis fenotípicos diversos causados pela intensa miscigenação genética da população brasileira.

1. Avaliar pela primeira vez a capacidade de oxidação de galactose em crianças com o diagnóstico de galactosemia no Brasil.
2. Avaliar a capacidade de oxidação da galactose em crianças saudáveis brasileiras;
3. Verificar se há um ponto de corte que seja um bom discriminante entre indivíduos portadores de galactosemia diagnosticada por meio do teste respiratório com a construção de uma curva de características de operação do receptor (ROC);

4.1 População de Estudo

Todas as crianças galactosêmicas com registro no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, SP, Brasil, foram convidadas a participarem do estudo. Havia uma estimativa de 14 crianças com a suspeita do diagnóstico de galactosemia sendo acompanhadas no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto no início do estudo. Um total de cinco crianças não conseguiram ser contatadas devido a perda de seguimento no hospital e mudança de endereço e telefone sem atualização dos dados nos registros do hospital, duas crianças eram residentes na região norte e nordeste do país e não conseguiram se deslocar até Ribeirão Preto a tempo de participarem da pesquisa e três crianças tiveram o diagnóstico de galactosemia descartado. Dessa forma, um total de quatro pais concordou em participar.

Três crianças galactosêmicas acompanhadas no Instituto da Criança em São Paulo também entraram para a amostragem. A idade das crianças variou de 1 a 7 anos.

Um material produzido pelo *Ross Metabolic Formula System* com orientações para o tratamento da doença foi traduzido e adaptado a população brasileira pela pesquisadora e como forma de incentivo à participação na pesquisa todos os responsáveis pelas crianças com a doença receberam o material traduzido (Anexo 1).

Foi selecionada também uma amostra de conveniência estratificada por idade e sexo de 21 crianças saudáveis acompanhadas no ambulatório de Puericultura do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, seguindo uma razão de 3:1 crianças saudáveis para cada criança galactosêmica. Essa razão foi baseada na necessidade de aumentar o tamanho da amostragem para a confecção da curva ROC que será abordada na análise estatística.

Os critérios para a não inclusão no trabalho foram:

- Doenças respiratórias
- Alergias alimentares
- Intolerância à lactose

Todos os responsáveis pelas crianças que participaram da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo comitê de ética em pesquisa, processo HCRP nº 2450/2011 em acordo com a resolução nº 196/96 CNS/MS.

4.2 Teste Respiratório

O teste respiratório de todas as crianças foi quantitativo para o enriquecimento de

$^{13}\text{CO}_2$ em ar expirado antes e depois da administração oral de uma solução aquosa contendo 7mg/kg de 1- ^{13}C -Galactose. As crianças estavam em um jejum de 2 horas antes da ingestão da solução. Após a coleta respiratória inicial, amostras foram coletadas nos tempos de 30,60,120 minutos. As amostras de ar expirado foram coletadas por meio do sopro dentro de tubos de ensaio utilizando um canudo para as crianças maiores que 5 anos. Para as crianças menores de 5 anos os tubos de ensaio foram posicionados logo abaixo de suas narinas e as crianças respiraram normalmente durante o tempo de 1 minuto, quando o tubo ficava esbranquiçado em virtude da condensação de vapor d'água do ar expirado, o que era sinal de que o ar havia sido coletado de forma satisfatória. As amostras foram coletadas em triplicata e armazenadas em local climatizado até a análise.

4.3 Mensuração do $^{13}\text{CO}_2$ no Ar

Em cada amostra de ar, a razão molar do $^{13}\text{CO}_2$ e $^{12}\text{CO}_2$ foi quantificado pela razão de massa/carga (m/z) dos isótopos estáveis por meio de um espectrômetro de massa. A análise foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massa – Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (Espectrômetro de Massa Europa ANCA 20/20[®] – Cheshire – UK). Os resultados foram expressos como Delta ($\Delta\%$) versus a rocha padrão, *PeeDee Belemnite* (PDB) (Figura 6).

O enriquecimento foi obtido subtraindo-se o $\Delta\%$ PDB de cada tempo do $\Delta\%$ PDB basal. Para determinar os micromoles de $^{13}\text{CO}_2$ liberados no ar expirado por minuto, a taxa de produção corporal total de CO_2 foi mensurada com a associação das equações de Shofield e de Weir (Weir et al., 1949; Shofield, 1985).

Após o cálculo do gasto energético basal (GEB) por Shofield, utilizou-se o quociente respiratório de 0,8 para o cálculo da produção de CO_2 pela equação de Weir, a qual relaciona o GEB com a produção de CO_2 e consumo de O_2 (Quadro 2).

Utilizando o valor da produção de CO_2 e os valores de enriquecimento isotópicos, a dose percentual de $^{13}\text{CO}_2$ recuperada em cada tempo foi obtida. Em seguida, com a integração das doses percentuais de $^{13}\text{CO}_2$ recuperadas em cada tempo pelo método trapezoidal calculou-se a taxa acumulativa de 1 – ^{13}C - galactose recuperada em $^{13}\text{CO}_2$ (CUMPCD) (Figura 8).

Figura8 – Integração das doses percentuais de $^{13}\text{CO}_2$ recuperadas em cada tempo pelo método trapezoidal

$$\text{CUMPCD} = \sum_{i=1}^n (\text{PCD}_i + \text{PCD}_{i-1})(t_i - t_{i-1})/2$$

Sendo:

n = valor no tempo final

i = valor no tempo atual

PCD = Dose percentual de $^{13}\text{CO}_2$

t = tempo

	Feminino	Masculino
Shofield	$\text{GEB} = 16,969(\text{P}) + 1,618(\text{E}) + 371,2$	$\text{GEB} = 19,59 (\text{P})^* + 1,303 (\text{E})^\# + 414,9$
Weir	$\text{V CO}_2 = \text{GEB}/134,25$	$\text{V CO}_2 = \text{GEB}/134,25$
	$\text{V CO}_2 (\mu\text{M}/\text{min}) = (\text{V CO}_2 \times 10^6) / (24\text{h} \times 60\text{min})$	

Quadro 2 – Equações utilizadas para o cálculo da produção de CO_2

*P = Peso (Kg)

^\#E = Estatura (cm)

4.4 Análise Estatística

A análise estatística verificou a existência de um ponto de corte, em cada tempo, da % acumulativa de carbono 13 que discrimine indivíduos tidos como positivo e negativos para galactosemia. Em seguida comparou-se, em média da % acumulativa de carbono 13, os grupos, em cada tempo e os tempos, no mesmo grupo.

Foi aplicada a metodologia de curva ROC (*receiver operating curve*) para verificar a possibilidade de se encontrar um ponto de corte que seja capaz de diagnosticar pacientes com galactosemia por meio do teste respiratório. Os valores de sensibilidade, de especificidade e áreas sob a curva (AUC), para cada ponto de corte das variáveis de interesse, foram calculados. O *software* utilizado foi o SAS versão 9.2.

Para a comparação em média da % acumulativa de carbono 13, foi proposto um modelo linear de efeitos mistos. Os modelos lineares de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) são utilizados na análise de dados nas quais as respostas de um mesmo indivíduo estão agrupadas e a suposição de independência entre observações num mesmo grupo não é adequada (Littel et al., 1996). Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos apresentem distribuição normal com média 0 e variância σ^2 . Para que esse pressuposto fosse atendido, uma transformação quadrática e logarítmica foi aplicada à variável resposta. Foi utilizado o procedimento PROC MIXED do software SAS 9.2 (2008).

5.1 Características da Amostragem

Um total de 7 crianças com galactosemia e 21 crianças sem a doença participaram do estudo, totalizando em uma amostra de 28 crianças.

Das sete crianças com a doença que participaram do estudo, duas eram do sexo feminino e cinco eram do sexo masculino. As crianças possuíam de 1 a 7 anos de idade e possuíam peso, estatura e IMC dentro da normalidade de acordo com as curvas da OMS 2007 (Tabela 1).

Tabela1 – Características antropométricas das crianças com galactosemia

Indivíduo	Idade (anos)	Sexo	Peso (Kg)	Estatura (m)	IMC (Kg/m ²)	Classificação
A1	7	F	33	1,39	17,07	Eutrofia
A2	7	M	21	1,2	14,58	Eutrofia
A3	7	M	18	1,1	14,87	Eutrofia
A4	6	M	25	1,27	15,50	Eutrofia
A5	1	F	10	0,78	16,43	Eutrofia
A6	6	M	17	1,13	13,31	Eutrofia
A7	1	M	11	0,88	14,20	Eutrofia

Com relação ao perfil genético, à atividade da enzima e à % de enriquecimento de ¹³CO₂ no tempo de 120 minutos, as crianças doentes comportaram-se de forma diferente umas das outras.

Os valores de atividade da GALT foram obtidos dos resultados dos exames desses pacientes feitos em Porto Alegre. Já as mutações foram obtidas da pesquisa intitulada “Análise do Perfil Genotípico de Pacientes com Galactosemia Clássica e Estudo da Relação Genótipo como Fenótipo”, que está sendo conduzida pelo Dr. Daniel Fantozzi, com orientação do Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior e co-orientação do Prof. Dr. José Simon Camelo Jr. Dados ainda a serem publicados.

Com relação a atividade de enzima GALT, três apresentavam atividade indetectável, as outras mostraram atividade variando de 1,3µmol/h/g Hb a 11µmol/h/g Hb. Quanto ao tipo de mutação, as três crianças que apresentavam atividade da GALT indetectável eram portadoras das mutações Q188R/Q188R, Q188R/S135L e Q188R/K285N e mostraram um enriquecimento do CO₂ com ¹³C de -1,53%, 4,05% e 0,19% respectivamente, o que demonstra que a portadora da mutação clássica em homozigose (Q188R/Q188R) não foi capaz de

metabolizar a galactose ingerida, uma vez que o total de carbono recuperado da galactose ingerida no tempo de 120 minutos foi menor do que no tempo basal, por isso seu resultado final foi um número negativo. A criança que apresentava atividade de enzima de 1,3 $\mu\text{mol/h/g Hb}$ não fez o sequenciamento gênico, pois perdeu o seguimento dos atendimentos no hospital e teve um enriquecimento de ^{13}C de 25,14%. A criança com atividade da GALT de 11 $\mu\text{mol/h/g Hb}$ tem a mutação Q188R/IVS 3 +1, e enriqueceu seu CO_2 com ^{13}C em 0,037% no tempo de 120 min. O indivíduo D5 que possui atividade de enzima 2 $\mu\text{mol/h/g Hb}$, é portador da mutação S135L/L275fs e enriqueceu 36% em 2 horas. A criança D7 enriqueceu pouco, 0,58% em 2 horas, ela é portadora da mutação M1T/Q188R e possui atividade da GALT de 3 $\mu\text{mol/h/g Hb}$ (Tabela 2).

Tabela 2 – Características gênicas, atividade de enzima e %enriquecimento do CO_2 com ^{13}C em 120min em crianças com galactosemia

Indivíduos	Idade (anos)	Sexo	Atividade GALT ($\mu\text{mol/h/g Hb}$)	Mutação	(%)Enriquecimento em 120 min
D1	7	F	11	Q188R/IVS3+1	0,037
D2	7	M	Não detectável	Q188R/Q188R	-1,53*
D3	7	M	Não detectável	Q188R/S135L	4,05
D4	6	M	1,3	Desconhecido	25,14
D5	1	F	2,0	S135L/ L275fs	36
D6	6	M	Não detectável	Q188R/K285N	0,19
D7	1	M	3,0	M1T/Q188R	0,58

*O menos indica que o enriquecimento do CO_2 com ^{13}C recuperado no ar expirado no tempo de 120 min foi menor do que no basal. Dessa forma, não houve enriquecimento.

As crianças sem a doença foram selecionadas no Ambulatório de Puericultura e Pediatria da Vila Lobato, na proporção de três crianças sem a doença para cada criança doente (3:1). Elas foram estratificadas por sexo e idade com as crianças doentes. À medida do possível, tentou-se selecionar crianças com o mesmo perfil antropométrico das crianças com galactosemia. O peso foi uma variável incluída para correção na análise estatística. Das 21 crianças selecionadas, 17 eram eutróficas e 3 estavam classificadas na faixa de sobrepeso de acordo com as curvas de peso/idade e IMC/idade da OMS 2007. As características antropométricas das crianças sem galactosemia estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Características antropométricas dos indivíduos sem galactosemia

Indivíduos	Idade (anos)	Sexo	Peso (Kg)	Estatura (cm)	IMC (kg/m ²)	Classificação
S1	7	F	29	1,4	14,79	Eutrofia
S2	7	F	31	1,41	15,59	Eutrofia
S3	7	F	20	1,2	13,88	Eutrofia
S4	7	M	18,4	1,08	15,77	Eutrofia
S5	7	M	20,5	1,2	14,23	Eutrofia
S6	7	M	30	1,4	15,30	Eutrofia
S7	7	M	30	1,32	17,21	Eutrofia
S8	7	M	34	1,4	17,34	Eutrofia
S9	7	M	23	1,21	15,70	Eutrofia
S10	6	M	21	1,16	15,60	Eutrofia
S11	6	M	20,2	1,16	15,01	Eutrofia
S12	6	M	26	1,3	15,38	Eutrofia
S13	1	F	7,7	0,68	16,65	Eutrofia
S14	1	F	11,2	0,84	15,87	Eutrofia
S15	1	F	11	0,75	19,55	Sobrepeso
S16	6	M	26,8	1,19	18,92	Sobrepeso
S17	6	M	19	1,16	14,12	Eutrofia
S18	6	M	21	1,2	14,58	Eutrofia
S19	1	M	9,6	0,73	18,01	Sobrepeso
S20	1	M	10,9	0,82	16,21	Eutrofia
S21	1	M	11,4	0,78	18,73	Sobrepeso

Assim, 21 crianças sem a doença foram selecionadas. As crianças apresentaram um enriquecimento de ^{13}C variando de 6,98% a 57,05% com uma mediana de 18,83% no tempo de 120 min (Tabela 4).

Tabela 4 – Características das crianças sem galactosemia

Indivíduo	Idade (anos)	Sexo	(%) Enriquecimento 120 min
S1	7	F	28,25
S2	7	F	37,47
S3	7	F	15,71
S4	7	M	29,72
S5	7	M	20,68
S6	7	M	27,19
S7	7	M	17,81
S8	7	M	9,94
S9	7	M	16,11
S10	6	M	14,3
S11	6	M	19,85
S12	6	M	15,65
S13	1	F	57,05
S14	1	F	11,77
S15	1	F	21,13
S16	6	M	21,8
S17	6	M	26,43
S18	6	M	6,89
S19	1	M	9,18
S20	1	M	27,67
S21	1	M	16,43

5.2 Perfil de Enriquecimento do CO_2 e % Acumulativa de $^{13}\text{CO}_2$ Recuperado Proveniente da Galactose Marcada

Foi observado que todas as crianças doentes tiveram um baixo enriquecimento do ^{13}C no ar expirado e, consequentemente, a % acumulativa de ^{13}C no ar expirado proveniente da galactose marcada (CUMPCD) também foi pequena, variou em média de 0,03% no tempo de 30 minutos a 1,67% no tempo de 120 minutos.

Em contrapartida, os indivíduos saudáveis apresentaram enriquecimentos e uma CUMPCD maiores, variando de 0,4% no tempo de 30 minutos a 5,58% no tempo 120 minutos como demonstrado na Tabela 5 e nas Figuras 9 e 10.

Tabela 5 –Descrição das variáveis, de acordo com grupo e tempo

Grupo	Tempo	n	Variável	Média	Desvio padrão	Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo
D	1	7	Enriquecimento	0,48	0,76	-0,17	-0,03	0,15	1,3	1,8
			% cumulativa	0,03	0,05	-0,02	0	0,01	0,09	0,13
	2	7	Enriquecimento	2,87	5,22	-0,67	0,03	0,24	5,95	13,58
			% cumulativa	0,22	0,37	-0,08	0	0,03	0,72	0,78
	3	7	Enriquecimento	9,21	15,02	-1,53	0,04	0,58	25,15	36,01
			% cumulativa	1,67	2,74	-0,4	0,04	0,11	5,05	6,19
S	1	21	Enriquecimento	5,47	6,69	0,43	2,04	2,86	5,3	28,35
			% cumulativa	0,4	0,45	0,05	0,12	0,25	0,34	1,63
	2	21	Enriquecimento	14,39	10,52	3,72	7,86	10,72	18,13	48,61
			% cumulativa	1,51	1,13	0,42	0,8	1,14	1,83	4,76
	3	21	Enriquecimento	21,48	11,21	6,9	15,66	19,85	27,19	57,06
			% cumulativa	5,58	2,93	1,69	3,48	5,68	7,47	14,09

Figura 9 –Boxplots das variáveis de interesse, de acordo com grupo e tempo: enriquecimento do CO₂ com ¹³C

Figura 10 – Boxplots das variáveis de interesse, de acordo com grupo e tempo: % cumulativa de $^{13}\text{CO}_2$ proveniente da galactose marcada com ^{13}C

5.3 Construção da Curva ROC

Para a seleção do melhor ponto de corte para o diagnóstico de uma doença por meio da curva ROC, deve-se levar em consideração área sobre a curva (AUC), a sensibilidade e a especificidade desejada.

A AUC é uma medida resumo usual do desempenho de um teste. Dado um indivíduo doente e outro não doente, ambos escolhidos ao acaso, esta medida é interpretada como a probabilidade do indivíduo portador da doença ter um resultado do teste diagnóstico de maior magnitude que aquele não doente (Begg, 1991).

Para este teste diagnóstico foi escolhido um ponto de corte com boa sensibilidade e especificidade, porém mais sensível do que específico.

No tempo de 30 minutos, a curva ROC apresentou uma área sobre a curva (AUC) de 0,94e no ponto de corte 0,05 foi obtido uma sensibilidade de 0,95 e uma especificidade de 0,71 (Figura 11).

Figura 11 – Curva ROC – Tempo 30 min.

No tempo de 60 minutos, a curva ROC mostrou uma AUC de 0,94, sensibilidade de 0,95 e especificidade de 0,71 no ponto de corte 0,46 (Figura 12).

Figura12 –Curva ROC – Tempo 60 min.

No tempo de 120 minutos, a curva ROC resultou em uma AUC de 0,84, sensibilidade de 0,95 e especificidade de 0,71 no ponto de corte 1,94 (Figura 13).

Figura 13 –Curva ROC – Tempo 120 min.

5.4 CUMPCD nos Diferentes Tempos e Entre os Grupos com Galactosemia e sem Galactosemia

Calculou-se a diferença da CUMPCD dos diversos grupos nos tempos 1 (30 minutos), tempo 2 (60 minutos) e no tempo 3 (120 minutos).

A comparação foi realizada entre os grupos doentes (D) e saudáveis (S) e nos mesmos grupos (D/D) ou (S/S).

Uma vez que a CUMPCD cresce diretamente proporcional ao tempo, os resultados das estimativas foram números negativos, uma vez que o cálculo foi feito entre a porcentagem acumulativa no tempo menor menos a porcentagem acumulativa no tempo maior, quando considerado o mesmo grupo.

O cálculo também resultou em número negativo nas comparações entre grupos (D/S), pois foi feito com a CUMPCD do grupo doente menos a CUMPCD do grupo saudável, o que indica que a porcentagem cumulativa de ^{13}C , no ar expirado, proveniente da galactose marcada no grupo doente, é sempre menor do que no grupo saudável, com uma diferença de 5,15% IC95% (7,93; 2,97) no tempo de 30 minutos, 6,21% IC95%(8,39;4,03) em 60 minutos e de 4,99% IC95% (7,17;2,82) em 120 minutos (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultado da comparação entre os grupos nos diversos tempos feitos em modelo linear de efeitos mistos

Comparações						IC95%		
Grupo	Tempo		Grupo	Tempo	Estimativa	p-valor	LI	LS
D	1	-	D	2	-2,03	< 0,01	-3,25	-0,81
D	1	-	D	3	-6,12	< 0,01	-7,34	-4,90
D	2	-	D	3	-4,09	< 0,01	-5,31	-2,87
S	1	-	S	2	-3,09	< 0,01	-3,81	-2,37
S	1	-	S	3	-5,97	< 0,01	-6,67	-5,26
S	2	-	S	3	-2,88	< 0,01	-3,59	-2,16
D	1	-	S	1	-5,15	< 0,01	-7,33	-2,97
D	2	-	S	2	-6,21	< 0,01	-8,39	-4,03
D	3	-	S	3	-4,99	< 0,01	-7,17	-2,82

Um total de 7 crianças com galactosemia e 21 crianças sem a doença participaram do estudo, totalizando em uma amostra de 28 crianças. Foi observado que todas as crianças doentes apresentaram uma baixa % acumulativa de ^{13}C no ar expirado proveniente da galactose marcada que variou em média de 0,03% no tempo de 30 minutos a 1,67% no tempo de 120 minutos. Em contrapartida, os indivíduos saudáveis apresentaram enriquecimentos e uma CUMPCD maiores, variando de 0,4% no tempo de 30 minutos a 5,58% no tempo 120 minutos. Para a seleção do melhor ponto de corte para o diagnóstico da doença utilizou-se a curva ROC e no tempo de 120 minutos o ponto de corte foi de 1,94.

6.1 O Uso de Fórmulas Preditivas em Detrimento da Calorimetria Indireta

De acordo com alguns autores, nenhuma fórmula preditiva de gasto energético basal é capaz de mensurar com precisão a produção total de CO_2 (Rating; Langhans, 1997). Outros autores entretanto, referem que quando aferido por longos períodos de tempo, o gasto energético total em crianças ativas foi subestimada pelas equações preditivas de Shofield, porém houve pequenas diferenças entre as fórmulas e as mensurações diretas ou indiretas de gasto energético basal e, consequentemente, de estimativa de produção de CO_2 (Cole et al., 1999). Outro fator que deve ser levado em consideração, em relação ao uso das fórmulas em detrimento da calorimetria indireta, é a viabilidade do método. O calorímetro é utilizado, na maioria das instituições, em uma grande variedade de pesquisas, necessitando de agendamentos prévios para sua utilização, assim, devido ao curto período de tempo em que as pesquisas necessitam ser realizadas, sua utilização torna-se pouco prática. Por isso, todos os autores que trabalham com testes respiratórios como alternativas para diagnóstico ou prognóstico de doenças metabólicas utilizam as equações preditivas para estimar a produção total de CO_2 .

6.2 Oxidação da Galactose em Crianças com Galactosemia e Sem a Doença

Nesse estudo, ficou evidente que há uma diferença marcante na oxidação da galactose em crianças com e sem galactosemia. Em todos os tempos, houve diferença na porcentagem acumulativa de $^{13}\text{CO}_2$ proveniente da galactose marcada entre os grupos doentes e saudáveis, o que pode ser visto na Tabela 5.

As crianças sem a doença recuperaram 5,58% do ^{13}C proveniente da galactose marcada no tempo 120 min, enquanto as crianças com a doença recuperaram em média apenas 1,67% nesse mesmo tempo. Isso mostra uma diferença de 4,99% ($p < 0,01$) na

porcentagem acumulativa de ^{13}C no ar expirado, proveniente da galactose marcada após 2 horas de ingestão da solução contendo 1 – ^{13}C -galactose entre os grupos sem e com a doença.

Elsas et al. (1993) dividiram os pacientes com galactosemia em dois grupos, aqueles que apresentavam um fenótipo clássico e variante e encontrou uma CUMPCD no tempo de 120 minutos menor que 1,48% nos doentes com manifestações mais graves (galactosemia clássica) e uma CUMPCD variando de 7,31 a 25,81% nos variantes. Tais valores foram menores do que os encontrados em todos os pacientes sem o diagnóstico da doença cuja porcentagem de carbono-13, proveniente da galactose, marcado no tempo de 120 minutos, variou de 8,47 a 28,23%.

Barbouth et al. (2007) também encontraram diferença significativa entre a capacidade de oxidação da galactose em crianças com a galactosemia e recém-nascidos de 2 e 14 dias sem a doença. Os autores encontraram um valor médio de CUMPCD no tempo de 120 minutos de 0,39% em crianças galactosêmicas com idade variando de 1 mês a 12 anos, entretanto, em recém nascidos sem a doença, com idade de 2 e 14 dias, foi recuperado em média de 4,4% e 9,96% do carbono-13 proveniente da galactose marcada.

Um outro ponto importante observado foi que um paciente com atividade eritrocitária baixa da GALT possui taxa de oxidação da galactose aumentada, semelhantes aos controles, o que foi observado no indivíduo D4, na Tabela 2. Essa criança apresentava atividade da GALT de 1,3 $\mu\text{mol/h/g}$ Hb mas atingiu um enriquecimento de $^{13}\text{CO}_2$ de 25,14% no tempo de 120 minutos e é uma criança que perdeu o acompanhamento clínico e desde então não segue corretamente o tratamento.

Alguns autores relacionam esse achado com a atividade residual da GALT em órgãos como o fígado, no qual a síntese e degradação da proteína mutante da GALT atinge um equilíbrio diferente daquele atingido nos eritrócitos. Além disso, deve-se notar que o enriquecimento de CO_2 com ^{13}C proveniente da 1- ^{13}C -galactose depende da quantidade corporal total do precursor não marcado. Assim, as crianças galactosêmicas tratadas devem possuir uma quantidade de galactose não marcada menor do que as crianças não tratadas (Barbouth et al., 2007).

Berry et al. (2004) apontam que há variações na capacidade hepática de oxidação da galactose em um tempo maior, 24 horas. Em seus achados, indivíduos com galactosemia a CUMPCD em 1 dia variou de 17 a 58% entre os participantes da pesquisa. Esse dado não é incompatível com a hipótese de que a atividade hepática residual da GALT e/ou fatores genéticos independentes da GALT determinem a capacidade oxidativa da galactose em indivíduos com galactosemia. O autor afirma que indivíduos com galactosemia são capazes de oxidar galactose em quantidade que se aproximam a indivíduos normais quando avaliados por maior período de tempo (5 a 8 horas). Dessa forma, a questão seria se essa oxidação é devida à atividade enzimática hepática residual ou se existe alguma via não dependente da GALT ainda

desconhecida. Na verdade, alguns estudos recentes sugerem que, em células de pacientes homozigotos para a mutação Q188R (forma clássica da doença), há atividade enzimática residual, entretanto, em pacientes com deleção em homozigose dos genes da GALT (uma mutação extremamente rara), seria impossível a existência de uma atividade residual da GALT. Algumas possibilidades seriam as vias independentes da GALT, incluindo as vias do galactonato e da UDP glicose pirofosforilase, além de alguma via ainda desconhecida como parte do metabolismo da galactose (Figura 14) (Abraham; Howell, 1969). A contribuição da atividade da UDP glicose pirofosforilase para a síntese da UDP galactose é desconhecida. Essa enzima deve utilizar tanto a galactose-1-fosfato quanto a UDP- galactose como substratos, como já proposto por Gitzelmann (1969). É importante identificar e caracterizar a nível molecular todas as proteínas envolvidas nessas vias, uma vez que a utilização dessas poderia ajudar a encontrar caminhos que possibilitem aumentar a tolerância à galactose em indivíduos com galactosemia.

Figura 14 – Galactose e o pool de galactose que ocorre proveniente da dieta e da produção endógena a partir do *turnover* de glicoproteínas, carboidratos complexos e lipídeos. A metabolização e excreção por diversas vias: (1) excreção urinária de galactitol e produtos do metabolismo, (2) a formação de galactonato por meio da galactose desidrogenase e sua excreção urinária, (3) a oxidação em CO₂ por meio do metabolismo do galactonato, a formação de galactose – 1 – P e sua subsequente disposição catalisada pela GALT residual resultando em UDP glicose pirofosforilase e por último em CO₂, (4) a possibilidade de um caminho desconhecido.

6.3 Curva ROC

Uma prática comum nas pesquisas em saúde é a busca de formas de descrever o como e o quanto uma variável contínua ou categórica ordinal é capaz de classificar um indivíduo em grupos definidos. Um exemplo típico é encontrado nos estudos laboratoriais nos quais deseja-se verificar o desempenho de um teste diagnóstico em classificar sujeitos como portadores ou não de determinada doença. A curva ROC ou *receiveroperator curve* é uma ferramenta destinada a descrever quantitativamente o desempenho de um teste diagnóstico cujo resultado pode ser tratado como uma variável contínua ou categórica ordinal (Zweig; Campbell, 1993).

Sendo a Sensibilidade de um teste (S) a probabilidade de um teste ser positivo dado que o indivíduo é portador da doença e a Especificidade (E) é a probabilidade de um teste ser negativo dado que o indivíduo não é portador da doença, um teste que gera a mesma proporção de resultados positivos para indivíduos doentes e não doentes, ou seja, $S = 1 - E$, não teria utilidade prática. Assim, a construção de um gráfico dos resultantes pares S e $1 - E$ constitui uma curva ROC (Altman et al., 1994). Neste caso, emprega-se uma regra de decisão baseada em buscar um ponto de corte no qual indivíduos com uma resposta ao teste maior que o mesmo é classificado com doente.

Portanto, cada ponto de corte associa-se a um particular par (S; $1 - E$) (Figura 15). De uma maneira geral, quanto menor for o ponto de corte maior será a habilidade do teste em classificar os doentes como positivos, ou seja, maior será S. Por outro lado, poderá ser inevitável que alguns indivíduos sadios sejam classificados como positivos, o que significa uma menor E. A escolha do melhor ponto de corte muitas vezes é representado pelo ponto no qual S e E são simultaneamente maiores. Em algumas situações, quando não se pode correr o risco de não diagnosticar, é melhor privilegiar S.

Figura 15 – Construção de uma curva ROC

Um teste que discrimina perfeitamente indivíduos doentes e não doentes teria, para algum ponto de corte, uma S e uma E de 100%, o qual seria representado no canto superior esquerdo da curva ROC. Já um teste totalmente incapaz de discriminar indivíduos doentes e não doentes produziria uma curva ROC representada por pontos que estariam contidos em uma reta que partiria da origem do gráfico até o canto superior direito.

Um último ponto a ser levado em consideração na construção de uma curva ROC é a área sob a curva. Essa é a medida resumo usual do desempenho de um teste, já que ela é estimada levando-se em conta todas as Sensibilidades e Especificidades relativas a cada um dos pontos estipulados. Dado um indivíduo doente e outro não doente, ambos escolhidos ao acaso, esta medida é interpretada como a probabilidade do indivíduo portador da doença ter um resultado ao teste diagnóstico de maior magnitude que aquele não doente (Begg, 1991). Um teste totalmente incapaz de discriminar indivíduos doentes e não doentes teria uma área sob a curva de 0,5. Quanto maior a capacidade do teste em discriminar os indivíduos segundo estes dois grupo, mais a curva se aproximaria do canto superior esquerdo do gráfico, e a área sob a curva seria próxima de 1 (Hanley; McNeil, 1982).

6.4 Detecção da Galactosemia e o Teste Respiratório

Ao colocar os resultados da porcentagem acumulativa de $^{13}\text{CO}_2$ no ar expirado proveniente da 1- ^{13}C -galactose ingerida em uma curva ROC, na curva feita no tempo 120 minutos, foi encontrado um ponto de corte de 1,94%, com AUC de 0,84, sensibilidade de 0,95 e especificidade de 0,71 (Figura 12). As curvas nos tempos de 30 e 60 minutos tiveram uma área sob a curva de melhor valor, 0,94 em ambas. Uma vez que essa medida é um resumo usual do desempenho de um teste pode-se deduzir que a triagem de indivíduos doentes seria mais provável nos tempos 30 e 60 minutos. Entretanto, o tamanho amostral de 28 crianças não foi grande o suficiente para atingir significância clínica para determinar se esse valor de oxidação da galactose poderia ser usado como um ponto para triar pacientes galactosêmicos, mas foi altamente sugestivo para o diagnóstico positivo da doença. Barbouth et al. (2007) tentou validar estudos usando a curva ROC no tempo de 120 minutos, utilizando 18 indivíduos doentes e 14 saudáveis. Ela encontrou um ponto de corte de 1,17%, com sensibilidade e especificidade de 0,97 e 0,96 respectivamente. No entanto, ela também não encontrou significância clínica devido ao seu tamanho amostral.

Dessa forma, uma vez que a galactosemia é uma doença cujo número de indivíduos afetados não atinge grandes magnitudes, é difícil estabelecer uma amostragem grande o

suficiente para fazer deste uma alternativa para o diagnóstico da doença, no entanto, pode-se afirmar que este estudo mostra que o teste respiratório é útil em discriminar crianças com deficiência na GALT.

6.5 Expressão Fenotípica e o Teste Respiratório

As mutações M1T, IVS3+1 L275fs e identificadas neste trabalho nunca foram descritas anteriormente, dessa forma a expressão fenotípica de portadores dessas mutações assim como a atividade da GALT e os mecanismos de oxidação da galactose nesses pacientes são diferenciados e precisam de outros estudos para melhor entendimento. A heterogeneidade genética brasileira documentada até hoje, sem dúvida, contribui para a heterogeneidade fenotípica que é observada nas crianças brasileiras portadoras de galactosemia.

De acordo com Berry et al. (1997) e Lai (1998), o teste respiratório com a ingestão de 1-¹³C-galactose é útil na delimitação do fenótipo metabólico de crianças com deficiência da GALT. Ele permite que se estabeleça o grau de deficiência na oxidação corporal de galactose nos pacientes e permite avaliar a gravidade da mutação em questão.

Outro estudo demonstrou que os pacientes com a galactosemia clássica eliminaram menos de 2% do *bolus* de 1-¹³C- galactose ingerida na forma de ¹³CO₂ no ar expirado no tempo de 120min (Berry et al., 2000). Em estudos anteriores, foi dado um ponto de corte de CUMPCD de 5% que foi significativo para discriminar a evolução de pacientes com deficiência da GALT (Weir, 1990; Guerrero et al., 2000; Webb et al., 2003).

Barbouth et al. (2007) sugerem que, se menos de 2% do ¹³CO₂ for recuperado no teste respiratório após 2 horas da ingestão da galactose marcada, as crianças devem iniciar a ingestão do leite de soja em substituição ao leite de vaca ou materno até se obter o resultado dos testes de triagem tradicionais. Com este cenário, não seria necessário a coleta de sangue e a intervenção seria feita antes que ocorresse danos neurológicos ou hepatocelulares.

Com o teste respiratório, foi possível verificar que nem sempre a atividade de enzima é um bom preditor de quanto da galactose a criança consegue oxidar. Na Tabela 2, podemos verificar que uma criança com atividade de enzima de 11 μmol/h/g Hb teve um enriquecimento de 0,037% de ¹³CO₂ no ar expirado, enquanto que outra criança com atividade de enzima não detectável teve um enriquecimento de 4,05%. Por conta dessas variações, provavelmente ocorreu a especificidade menor, comparada ao estudo de Barbouth et al. (2007). De acordo com Berry et al. (1997), o teste respiratório é mais útil em estabelecer quais pacientes manifestam ou são capazes de manifestar a doença semelhantemente aos pacientes

com a mutação clássica (Q188R/Q188R). Ele não revela quais pacientes com uma capacidade oxidativa normal no tempo de 2h manifestará tolerância anormal à galactose caso consuma alimentos fonte de lactose. A quantidade e duração da ingestão de lactose requerida para induzir problemas clínicos em pacientes com genótipos variantes são desconhecidas.

1. Houve uma diferença marcante na oxidação da galactose em crianças com e sem galactosemia, com apenas uma exceção. A recuperação da galactose marcada em $^{13}\text{CO}_2$ em crianças saudáveis foi extremamente maior do que em crianças com a galactosemia;

2. As mutações MIT, IVS3+1 eL275fs identificadas neste trabalho nunca foram descritas anteriormente, dessa forma a expressão fenotípica de portadores dessas mutações assim como a atividade da GALT e os mecanismos de oxidação da galactose nesses pacientes são diferenciados e precisam de outros estudos para melhor entendimento. A heterogeneidade genética brasileira documentada até hoje, sem dúvida, contribui para a heterogeneidade fenotípica que é observada na galactosemia.

3. O tamanho amostral de 28 crianças não foi grande o suficiente para atingir significância clínica para determinar se esse valor de oxidação da galactose poderia ser usado como um ponto para triar pacientes Galactosêmicos. Dessa forma, uma vez que a galactosemia é uma doença cujo número de indivíduos afetados não atinge grandes magnitudes é difícil estabelecer uma amostragem grande o suficiente para fazer deste uma alternativa para o diagnóstico da doença, no entanto, pode-se afirmar que este estudo mostra que o teste respiratório é útil em discriminar crianças com deficiência na GALT;

4. O teste respiratório com a ingestão de 1- ^{13}C -galactose é útil na delimitação do fenótipo metabólico de crianças com deficiência da GALT. Ele permite que se estabeleça o grau de deficiência na oxidação corporal de galactose nos pacientes e permite avaliar a gravidade da mutação em questão. Dessa forma, o teste respiratório, além de permitir que o médico determine se uma criança com um genótipo definido possui um fenótipo oxidativo semelhante ao grupo de pacientes com a doença mais grave, pode ser um ponto de partida para outros estudos que objetivam delimitar a quantidade de galactose que cada criança será capaz de ingerir, melhorando, assim, sua qualidade de vida e aumentando a variabilidade de sua dieta.

REFERÊNCIAS

Abraham HD, Howell RR. Human hepatic uridinediphosphategalactosepyrophosphorylase. *J Biol Chem*. 1969;244(3):545-50.

Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ*. 1994;309(6948):188.

Azevedo DA. Espectrometria de Massa. Laboratório de Espectrometria de Massa, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

Barbouth DS, Velazquez DL, Konopka S, James JD, Carver VH, Elsas LJ. Screening newborns for galactosemia using total body galactose oxidation to CO₂ in expired air. *Pediatr Res*. 2007;62:720-4.

Begg CB. Advances in statistical methodology for diagnostic medicine in the 1980's. *Stat Med*. 1991;10(12):1887-95.

Berry GT, Nissim I, Gibson JB, Mazur AT, Lin Z, Elsas LJ, Singh RH, Klein PD, Segal S. Quantitative assessment of whole body galactose metabolism in galactosemic patients. *Eur J Pediatr*. 1997;156:S43-9.

Berry GT, Palmieri M, Gross KC, Acosta PB, Henstenburg JA, Mazur A, Reynolds R, Segal S. The effect of dietary fruits and vegetables on urinary galactitol excretion in galactose – 1 – phosphate uridylyltransferase deficiency. *J Inherited Metab Dis*. 1993;16:91-100.

Berry GT, Reynolds RA, Yager CT, Segal S. Extended [13C]galactose oxidation studies in patients with galactosemia. *Mol Genet Metabol*. 2004;82(2):130-6.

Berry GT, Segal S, Gitzelmann R. Disorders of galactose metabolism. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH, editors. *Inborn metabolic diseases*. 4th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2006. p. 121-30.

Berry GT, Singh RH, Mazur AT, Gerrero N, Kennedy MJ, Chen J, Reynolds R, Palmieri MJ, Klein PD, Segal S, Elsas LJ. Galactose breath testing distinguishes variant and severe galactose – 1 – phosphate uridylyltransferase genotypes. *Pediatr Res*. 2000;48(3):323-8.

Bosch AM, Grootenhuis MA, Bakker HD, Heijmans HAS, Wijburg FA, Last BF. Living with classical galactosemia: health-related quality of life consequences. *Pediatrics*. 2004;113(5):e423-8.

Bosch AM. Classical galactosaemia revisited. *J Inher Metab Dis*. 2006;29(4):516-25.

Camelo JS Jr, Fernandes MIM, Maciel LMZ, Scrideli CA, Santos JLF, Camargo AS Jr, Passador CA, Leite PC, Resende DR, Souza LO, Giugliane R, Jorge SM. Galactosemia in Brazilian population: high incidence and cost-benefit. *J Inherited Metab Dis*. 2009;32 Suppl 1:S141-9.

Clague A, Thomas A. Neonatal biochemical screening for disease. *ClinChimActa*. 2002;315(1-2):99-110.

Clarke JTR. A clinical guide to inherited metabolic diseases. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.

Cole CR, Rising R, Hakim A, Danon M, Mehta R, Choudhury S, Sundaresh M, Lifshitz F. Comprehensive assessment of the components of energy expenditure in infants using a new respiratory chamber. *J Am CollNutr*. 1999;18(3):233-41.

Demmelmaier H, Sauerwal T, Richter T, Koletzko B. New insight into lipid and fatty acid metabolism via stable isotopes. *Eur J Pediatr*. 1997;156 Suppl 1:S70-4.

Demmelmaier H, von Schenck U, Behrendt E, Sauerwald T, Koletzko B. Estimation of arachidonic acid synthesis in fullterm neonates using natural variation of ¹³C-abundance. *J PediatrGastroenterol Nutr*. 1995;21(1):31-6.

Elsas LJ, Ellerin NP, Klein PD. Practical methods to estimate whole body leucine oxidation in maple syrup urine disease. *Pediatr Res*. 1993;33(5):445-51.

Gitzelmann R. Formation of galactose-1-phosphate from uridinediphosphate in erythrocytes from patients with galactosemia. *Pediatr Res*. 1969;3(4):279-86.

Gregg CT, Huston JY, Prime JR, Ott DG, Furchner JE. Substantial replacement of mammalian body carbon with carbon-13. *Life Sci*. 1973;13(7):775-82.

Gregg CT. Some applications of stable isotopes in clinical pharmacology. *Eur J ClinPharmacol*. 1974;7:315-9.

Guerrero NV, Singh RH, Manatunga A, Berry GT, Steiner RD, Elsas LJ. Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosemia. *J Pediatr*. 2000;137(6):833-41.

Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982;143(1):29-36.

Henderson H, Leisegang F, Brown R, Eley B. The clinical and molecular spectrum of galactosemia in patients from the Cape Town region of South Africa. *BMC Pediatr.* 2002 Sep;2:7.

Holton JB, Walter JH, Tyfield LA. Galactosemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1553-87.

Hughes JMB, Ryan SMB, Lambert DMS, Geoghegan OBS, Clark ABS, Rogers YMS, Hendroff UBA, Monavari AMB, Twomey EMB, Treacy EP. Outcomes of sibsblings with classical galactosemia. *J Pediatr.* 2009;154(5):721-6.

Jongh WA, Bro C, Ostergaard S, Regenber B, Olsson L, Nielsen J. The roles of galactitol, galactose-1-phosphate, and phosphoglucomutase in galactose-induced toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *BiotechnolBioeng.* 2008;101(2):317-26.

Kaufman FR, McBride-Chang C, Manis RR, Wolff JA, Nelson MD. Cognitive functioning, neurologic status and brain imaging in classical galactosemia. *Eur J Pediatr.* 1995;154(7 Suppl 2):S2-5.

Koletzko B, Demmelmair H, Hartl W, Kindermann A, Koletzko S, Sauerwald T, Szitanyi P. The use of stable isotope techniques for nutritional and metabolic research in paediatrics. *Early Hum Dev.* 1998;53 Suppl:S77-97.

Koletzko B, Sauerwald T, Demmelmair H. Safety of stable isotpe use. *Eur J Pediatric.* 1997;145:660-78.

Koletzko S, Haisch M, Seeboth I, Braden B, Hengels K, Koletzko B, Hering P. Isotope selective non-dispersive infrared spectrometry for detection of *Helicobacter Pylori* infection with ¹³C-urea breath test. *Lancet.* 1995;345(8955):961-2.

Krumbiegel P. *Stable isotope pharmaceutical for clinical research and diagnosis*. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1991.

Lai K, Langley SD, Dembure PP, Hjelm LN, Elsas LJ. Duarte allele impairs biostability of galactose-1-phosphate uridyltransferase in human lymphoblasts. *Hum Mutat.* 1998;11(1):28-38.

Littell RC, Milliken GA, Sroup WW, Wolfinger RD. *SAS System for Mixed Models*. Cary, NC: SAS Institute Inc; 1996.

Lo SM, Choi M, Liu J, Jain D, Boot RG, Kallemejim WW, Aerts JMFG, Pashankar F, Kupfer GM, Mane S, Lifton RP, Mistry PK. Phenotype diversity in type 1 Gaucher disease: discovering the genetic basis of Gaucher disease/hematologic malignancy phenotype by

individual genome analysis. *Blood*. 2012;119(20):4731-40.

Nelson D. Verbal dyspraxia in children with galactosemia. *Eur J Pediatr*. 1995;154(7 Suppl 2):S6-7.

Padilla CD, Dans LF, Estrada SC, Tamondong MR Jr, Laceste JJ, Bernal RM. Cost-benefit analysis of newborn screening for galactosemia in the Philippines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003;34 Suppl 3:215-20.

Rating D, Langhans CD. Breath tests: concepts, applications and limitations. *Eur J Pediatr*. 1997;156 Suppl 1:S18-23.

SAS Institute Inc. SAS/STAT® User's Guide, Version 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2008.

Schweitzer-Krantz S. Early diagnosis of inherited metabolic disorders towards improving outcome: the controversial issue of galactosemia. *Eur J Pediatr*. 2003;162 Suppl 1, S50-3.

Shield JPH, Wadsworth EJK, MacDonald A, Stephenson A, Tyfield L, Holton JB, Marlow N. The relationship of genotype to cognitive outcome in galactosaemia. *Arch Dis Child*. 2000;83(3):248-50.

Shofield WN. Predicting basal metabolic rate, new standards and review of previous work. *Hum NutrClin*. 1985;39 Suppl 1:5-41.

Webb AL, Singh RH, Kennedy MJ, Elsas LJ. Verbal dyspraxia and galactosemia. *Pediatr Res*. 2003;53(3):396-402.

Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *Nutrition*. 1990;6(3):213-21.

Weir JR. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol*. 1949;109(1-2):1-9.

Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *ClinChem*. 1993;39(4):561-77.

ANEXO A

Um Guia Para a Família de Crianças com Galactosemia

(Tradução do material de Ross Metabolic Formula System)

Conteúdo

O que é Galactosemia
Sintomas e Diagnóstico da Galactosemia
Tratamento da Galactosemia
Suporte Nutricional na Galactosemia
Verificando o Progresso de seu filho (a)
Problemas de alimentação
O papel de irmãos mais velhos no manejo dietético
Outros cuidados e suporte nutricional
A dieta de seu filho(a) durante a doença
Galactosemia: Um Erro Inato do Metabolismo
Perspectivas para o futuro
Tabelas de Alimentos

Introdução a Galactosemia

Seu filho(a) possui uma condição chamada *galactosemia*. Crianças que herdam esta desordem não podem usar a galactose (GAL) de forma normal. A Galactose é um açúcar encontrado no leite e produtos feitos com leite, assim como em vários outros alimentos e alguns medicamentos. Essa inabilidade de usar a GAL dá à essa doença o nome de galactosemia.

Você precisará alimentar sua criança com todos os alimentos necessários ao bom crescimento e desenvolvimento evitando os alimentos que contêm GAL. Compreender alguns termos nutricionais e genéticos ajudará a manejar melhor a dieta de seu filho(a). Se você tiver dúvidas, escreva-as e pergunte ao seu nutricionista, enfermeira ou médico no ambulatório/clínica em que seu filho é acompanhado.

O que é Galactosemia?

Galactosemia é uma doença inata (a criança nasce com ela) na qual a GAL aumenta no corpo porque a GAL não pode ser transformada no açúcar que o corpo usa para fabricar energia – a glicose (GLI). Todos os tipos de leite e produtos feitos ou derivados do leite contêm GAL em forma de Lactose, também conhecido como açúcar do leite. Muitos outros alimentos e medicamentos também contêm galactose. Esses alimentos e medicamentos serão listados mais adiante.

Para transformar a GAL em GLI para produção de energia, é necessário uma substância especial chamada *enzima*. O primeiro passo do processo é a quebra da lactose em galactose e glicose. Pense na enzima como um tesoura que corta a lactose em galactose e glicose. Essa enzima se chama *lactase*.

Uma vez que a galactose é separada da glicose e absorvida, ela é normalmente transformada em glicose dentro do corpo. O corpo usa a glicose para gerar energia para crescer, movimentar e fazer todas as funções do corpo. Para transformar a galactose em glicose, outra enzima, chamada *galactose-1-fosfato uridiltransferase* (GALT) é necessária.

Algumas pessoas, como a sua criança, não tem GALT o suficiente para transformar a galactose que está nos alimentos que elas ingeriram em glicose. Por isso, a GAL não pode ser usada normalmente, e a GAL ou os produtos da GAL (como o galactitol, galactose-1-fosfato e galactonatos) acumulam no corpo.

Pense na situação como um sinal de trânsito (veja figura 1). O sinal verde (GALT normal) permite que a GAL seja usada normalmente. Um sinal vermelho (GALT insuficiente) impede que a galactose seja usada normalmente. Quando isso ocorre, galactitol, assim como GAL, galactose-1-fosfato e galactonatos acumulam no sangue e tecidos, são eliminados na urina, e causam os sintomas da galactosemia.

Figura 1: Metabolismo da Galactose na Galactosemia

Sintomas e Diagnóstico da Galactosemia

Em pacientes galactosêmicos não tratados, o acúmulo de galactose, galactitol, 1-fósforo-galactose e galactonato afeta todo o corpo. Sinais e sintomas de galactosemia incluem:

- Retardo no desenvolvimento, o que significa que a criança não cresce normalmente;
- Icterícia prolongada no recém-nascido, que é o amarelamento da pele e olhos, causada pela bile produzida no fígado e acumulada no corpo;
- Náusea, vômitos e/ou diarreia;
- Septicemia (“envenenamento do sangue”) causada pela bactéria *E.coli*, o que pode levar a morte se não tratada imediatamente;
- Hepatomegalia (aumento do tamanho do fígado);
- Aumento do baço;
- Hepatite (inflamação do fígado);
- Catarata (doença dos olhos que pode resultar em cegueira).

Além disso, as complicações tardias podem incluir retardo no desenvolvimento, anormalidades na fala, diminuição do crescimento, diminuição do desenvolvimento dos ossos, e, em mulheres, insuficiência ovariana. Na primeira infância, o tratamento com dieta restrita em galactose causa uma mudança radical em todos esses sintomas e sinais. A náusea e o vômito param, o que significa que pode ocorrer ganho de peso; o tamanho do fígado volta ao normal; a catarata, se existente, regride.

Tratamento da Galactosemia

O tratamento que o seu filho(a) recebe depende do quanto a enzima GALT está funcionando. Galactosemia é tratada restringindo a galactose da dieta. Como já dissemos, a maior parte da galactose encontra-se em leite e produtos do leite, mas outros alimentos contêm a galactose também.

Um leite ou fórmula sem lactose, a base de soja, deve ser usado para fornecer boa nutrição para as crianças com galactosemia. Enquanto que as fórmulas sem lactose devem ser dadas por toda a vida para garantir vitaminas e cálcio e outros minerais, outros alimentos sem galactose devem ser adicionados à dieta nas idades apropriadas.

Duas listas com os alimentos permitidos são dados no final deste livro – um para bebês e outro para crianças e adultos. Alimentos livre de galactose ou que possuem menos que 5miligramas (mg) por 100 gramas (g) de alimento podem ser ingeridas em quantidades ilimitadas. Alimentos com mais de 20mg de galactose por 100g de alimento não devem ser ingeridos. Alimento com uma quantidade de galactose entre 5mg e 20mg por 100g de alimento são permitidos quando a enzima GALT tem alguma atividade desde que liberados pelo seu nutricionista ou médico. O nutricionista ou o médico lhe dirão quais alimentos sua criança com galactosemia pode comer.

A dieta restrita em galactose não deve NUNCA ser diminuída ou parada.

Fórmulas sem lactose: AptamilSoy, NanSoy, Nan sem lactose, Nutrisson, IsomilSoy, SoyMilke.

Suporte Nutricional na Galactosemia

Uma dieta que reduz a ingestão de galactose é usada para ajudar a prevenir a maioria dos sintomas da galactosemia. Essa dieta pode diminuir os níveis de galactose, galactitol, galactose – 1 – fosfato e de galactonato no sangue a quantidades que permitem desenvolvimento neurológico e crescimento normais.

Requerimento de proteína, energia e cálcio.

Seu filho(a) precisa uma dieta especial que restringe a galactose mas ainda inclui quantidade suficiente de proteínas, energia (caloria), vitaminas e minerais – incluindo o cálcio – para o crescimento adequado e desenvolvimento ósseo. Frequentemente mudanças na dieta serão necessárias, especialmente durante os primeiros anos de vida, quando a criança está crescendo rapidamente. O nutricionista ou o médico fará essas mudanças alimentares baseando-se na saúde de sua criança, no crescimento e níveis de galactose, galactitol, gal-1-fosfato e galactonato no sangue.

Ao evitar o leite e produtos do leite, a ingestão de cálcio é significativamente reduzido. Cálcio é essencial para os ossos e dentes. As meninas e mulheres jovens com galactosemia geralmente precisam tomar estrogênio para manter a força dos ossos. Meninas e meninos, homens, mulheres e jovens devem ingerir cálcio o suficiente para ajudar a manter a força nos ossos.

As fórmulas sem lactose possuem gosto diferente do leite. Seu filho(a) apenas a aceitará se você aparentar gostar também. As outras crianças da família que não têm galactosemia devem ser informadas de que as fórmulas sem lactose são muito importantes, e elas não devem enfatizar a diferença em gosto e odor entre o leite e as fórmulas para as crianças com galactosemia. A maioria das crianças galactosêmicas aceitam bem as fórmulas, principalmente se iniciadas bem cedo e sua família mostrar apoio.

Alimentando com as fórmulas (para crianças menores de 1 ano)

Alimente seu filho com galactosemia assim como você alimentaria qualquer outra criança. As fórmulas isentas de lactose não precisam ser aquecidas. No entanto, se você quiser aquecer a mamadeira com a fórmula, coloque-a em banho maria. Não use o microondas, pois a fórmula pode ser superaquecida e seu filho pode se queimar.

Segure seu bebê perto e o aconchegue durante a amamentação. Apoie a cabeça dele na dobra de seu cotovelo. Você provavelmente precisará colocar alguns travesseiros para apoiar o braço. Seu filho deve ficar de frente para você. Toque o meio de seu lábio inferior com o bico da mamadeira. Ele abrirá a boca e começará a sugar o bico. Incline a mamadeira para evitar que o bebê ingira ar. Nunca apoie a mamadeira na boca no bebê pois ele pode engasgar. E nunca o coloque para dormir com a mamadeira – o acúmulo de fórmula na boca pode causar sérios danos em seus dentinhos. Uma ou duas vezes, durante a amamentação e após a amamentação, tente fazer o beber arrostar para eliminar o ar engolido.

Introdução de alimentos sólidos (menores de 1 ano)

Nenhum bebê nasce com a coordenação para engolir alimentos sólidos. Antes de 3 ou 4 meses de idade a língua do bebê tende a fazer o movimento de protusão, dificultando o movimento de deglutição. O melhor é esperar para dar alimento sólido quando o desenvolvimento do bebê esteja adequado, geralmente por volta do 4º mês de idade. Coloque um pouco de comida como auxílio de uma colher pequena para bebês no meio da língua da criança. Tente outras vezes caso ele rejeite a comida nas primeiras tentativas.

Aos 7 a 8 meses de idade, seu filho deve começar a tentar ingerir a comida sozinho. Por volta de 9 meses de idade seu filho deve iniciar os primeiros esforços para usar a colher.

Não se preocupe se seu filho(a) não comer toda a comida que você oferecer; apenas anote o que ele recusou. O nutricionista ou o médico de seu filho lhe dará os devidos conselhos sobre quando seu filho deve iniciar cada tipo de alimento. Siga o conselho deles.

Quando seu filho estiver mais velho, as diferenças entre a dieta restrita que ele deve seguir e a dieta das outras crianças serão maiores do que quando ele era um bebê. Uma criança com galactosemia precisará fórmulas isentas de lactose por toda a vida para lhe fornecer a quantidade necessária de proteína, minerais e vitaminas.

Checando o progresso de seu filho(a)**Teste sanguíneo**

O sangue e a urina de seu filho(a) serão frequentemente testados para a presença de galactose (GAL) , galactose-1-fosfato (gal-1-p) ou galactitol. Muitos médicos pedirão uma amostra de urina ou de sangue uma vez por semana durante os primeiros 6 meses de idade, depois a cada 2 semanas até completar 1 ano. Após 1 ano de idade, a frequência de pedido de exames de sangue, de urina e inquéritos alimentares será reduzida a aproximadamente 1 vez por mês ou menos, dependendo da

evolução da criança e do controle da GAL, gal-1-p e do galactitol. A frequência que seu filho fará exames será determinada pelo médico.

Níveis de GAL-1-P em células sanguíneas vermelhas e de Galactitol urinário

A concentração de gal-1-p em células vermelhas do sangue e o galactitol urinário são medidas indiretas da quantidade de galactose nos tecidos corporais. As células vermelhas normalmente possuem uma quantidade muito baixa de gal-1-p (menos de 2mg/dl) e a urina não deve conter galactitol. O preocupante é o efeito de altos níveis dessas substâncias nos ovários de meninas, no cérebro, fígado, rins e olhos de todos os pacientes. Se uma grande quantidade de gal-1-p e galactitol é acumulada, é possível ocorrer uma falha ovariana, diminuição do crescimento e desenvolvimento mental e catarata. Pode causar também danos no fígado e rins.

Durante 3 dias antes da coleta de amostras de sangue e urina, você deverá fazer um registro de tudo que seu filho comer e beber nesse período. Registre o nome da comida e a quantidade exata em que seu filho(a) comeu. Colocar em medidas caseiras essas quantidades (colher de sopa, de chá, de café, copo, colher de servir).

Visitas Clínicas

Uma vez que a galactosemia é uma condição para toda a vida e pode causar danos no crescimento e desenvolvimento se a dieta adequada não for seguida corretamente, você será acompanhada por um médico e fará visitas clínicas frequentemente no começo. Se o crescimento e desenvolvimento do seu filho(a) está normal e se os níveis de gal-1-p e galactitol permanecem dentro da faixa de normalidade, seu médico deve recomendar visitas clínicas menos frequentes.

Nas vistas clínicas, seu filho (a) pode fazer exames laboratoriais, testes de desenvolvimento, físicos e neurológicos. As meninas também podem fazer exames para checar os hormônios femininos. A interação familiar também pode ser avaliada. A equipe de saúde precisa saber como a família está se ajustando às necessidades especiais da criança. Mudanças na dieta podem ser feitas se necessário e qualquer pergunta que você tiver será respondida.

O Crescimento e Desenvolvimento de seu filho (a)

Aos 4 a 6 meses de idade o peso de nascimento de seu filho deverá ter dobrado. A criança com galactosemia cujos níveis de ingestão de GAL estão controlados e que tem uma dieta adequada em nutrientes deve crescer tão bem quanto uma criança sem galactosemia.

Durante o segundo semestre de vida, a velocidade de crescimento diminui. A criança cresce em média 4 cm durante todo esse período. Essa diminuição no crescimento é esperada e está associada à uma diminuição no apetite.

Apesar das necessidades energéticas e de proteínas por kg de peso corporal diminuir, a quantidade total diária recomendada para a maioria dos nutrientes aumenta com a idade. Você deverá ajustar as escolhas alimentares da sua criança para assegurar que seu filho(a) receba uma nutrição adequada. O nutricionista o ajudará com a seleção dos alimentos que são adequados para o seu filho nas diversas fases do desenvolvimento e crescimento.

Interação Social no Horário de Refeição

O horário da refeição é uma parte importante do desenvolvimento social de toda criança. Sempre que possível, a família deve comer junta. Crianças mais novas podem aprender como se alimentarem sozinhas observando seus pais ou irmãos mais velhos.

Faça refeições para sua criança com galactosemia o mais similar possível da refeição do restante da família. Por exemplo, sempre que possível, use as mesmas frutas e verduras para todos da família. A ajuda e suporte familiar são muito importante na manutenção da dieta de seu filho.

Crianças de 1 a 3 anos

Nessa fase há uma diminuição no ritmo do crescimento quando comparado com lactentes. Nesse idade, as crianças ganham em média de 2 a 3 kg por ano quando lactentes ganham de 6 a 10 kg por ano. O crescimento nesse período envolve mudanças na forma do corpo. As pernas ficam mais longas e a gordura corporal diminui. A necessidade energética diminui devido à diminuição na taxa de crescimento. Entretanto, a necessidade de vitaminas e minerais aumentam.

Essas crianças procuram independência e são muito curiosas a cerca do meio em que vive. Uma vez que crianças nessa idade querem fazer as coisas sozinhas, encoraje seu filho a se alimentar sozinho. Evite alimentos que podem causar engasgos, como sementes, uvas, amendoins e nozes.

Pré-escolares

Pré-escolares também têm um ganho ponderal lento, 2 a 3kg por ano. Por outro lado, sua necessidade energética total são maiores que de crianças de 1 a 3 anos. Por isso você precisa aumentar o número de alimentos com fontes de energia, vitaminas e minerais.

Deixe seu filho(a) tomar algumas decisões. Por exemplo, deixe-o escolher qual cereal, fruta ou vegetal gostaria de comer dentro de uma lista de permitidos. Esteja ciente de que a maioria dos pré-escolares querem fazer suas coisas em seu próprio ritmo. Esteja preparado para perceber que nesse período seu filho mais fala do que come. Este é um comportamento normal.

Hábitos Alimentares de Crianças

Crianças, às vezes, possuem um de dois comportamentos alimentares típicos que causam preocupação nos pais. Eles podem decidir parar de comer ou eles podem querer comer sempre os mesmos alimentos.

Quando elas param de comer e não estão doente (gripadas, dores de ouvido, febre, etc.) ofereça os alimentos nos horários usuais. Se ele recusar o alimento, apenas tire-o. Ofereça apenas água nos intervalos das refeições. Ele ficará com fome e então comerá. Isso não trará danos ao seu filho a menos que a recusa por se alimentar dure mais de 3 dias. Nesse caso procure seu pediatra.

Não ofereça alimentos restritos na dieta para galactosemia durante a recusa alimentar. O nutricionista pode auxiliar durante esse período de tentativa, então não hesite em chamá-lo. Se sua criança comer alimentos não permitidos, os níveis de gal-1-p e galactitol aumentarão e o crescimento e desenvolvimento do seu filho(a) ficará comprometido.

A criança que está tendo preferências sempre pelos mesmos alimentos por longos períodos, se os alimentos forem nutritivos e forem permitidos na dieta, não há motivo de preocupação.

Ensinando seu filho(a) a gerenciar a dieta

Você pode começar a explicar a dieta chamando os alimentos permitidos de “especiais” ou “só para você”. A partir da infância ensine seu filho a perguntar sobre todos os alimentos não familiares antes de comer. À medida que seu filho crescer e começar a entender o conceito de enzima não funcionante, explique sobre a galactosemia.

Deixe seu pré-escolar fazer as escolhas alimentares, como o auxílio de um guia de alimentos permitidos. Planeje refeições com cores, texturas, sabores e formas de preparo variados. Uma criança que está envolvida na escolha e preparo dos alimentos será mais interessada em experimentar novos alimentos. Envolver seu filho(a) no planejamento do cardápio, assim ele se familiarizará com os alimentos permitidos e não permitidos. Aos 4 anos de idade, a criança quer se servir sozinha. Ensine a ela os alimentos permitidos e não permitidos.

Problemas Alimentares

Os pais tendem a tratar seus filhos galactosêmicos como crianças doentes e não seguem o padrão usual de criação. A criança com galactosemia é uma criança normal que precisa gerenciar a ingestão alimentar com mais cuidado. Peça ajuda à equipe de saúde caso seu filho(a) apresentar algum dos problemas a baixo.

Perda de Apetite

Pode ser resultado de várias causas, incluindo doença; comer quantidade excessiva de doces ou sobremesas, que pode satisfazer o apetite e diminuir o desejo de comer alimentos prescritos; beber muita fórmula isenta de lactose, o que pode diminuir o apetite por outros alimentos.

Fome

Fome não usual pode ser indicativo que a dieta precisa de ajustes. A quantidade da fórmula isenta de lactose pode necessitar de aumento uma vez que os alimentos sólidos não estão satisfazendo a criança. Ou a criança pode estar recusando o alimento para conseguir a sobremesa ou doces.

Recusa da Fórmula Isenta de lactose

A criança pode recusar o leite sem lactose devido a variações no apetite. Se ele não for oferecido regularmente há maiores chances de recusa. Uma criança pode recusar as fórmulas para ter atenção, especialmente se ela percebe que seus pais ficam ansiosos para que ela tome toda a fórmula.

Recusa de Alimentos Sólidos

Aqui também a criança pode estar experimentando apenas uma variação normal no apetite ou no sabor de alguns alimentos. Recusa alimentar e escolha de determinados tipos de alimentos de forma repetitiva é comum durante toda a infância. Ou a quantidade da fórmula isenta de lactose está muito alta, o que pode causar diminuição no apetite.

Comportamentos Alimentares Inapropriados

Comportamentos como recusa em se livrar da mamadeira, ou dificuldade em comer sólidos, mastigar, ou se servir pode ser resultado de uma série de variáveis. Essa incluem atraso no

oferecimento de alimentos sólidos, no oferecimento do leite sem lactose no copo, ou em permitir que a criança coma com as mãos ou com a colher.

Quando os pais oferecem comida para a criança durante tempo a mais que o necessário podem provocar atraso no aparecimento de autocontrole alimentar. Esteja ciente de que pequenas quantidades de comida serão desperdiçadas quando seu filho(a) começar a comer sozinho(a).

A criança pode estar utilizando sua dieta para chamar atenção ou manipular seus pais. Se seu filho(a) tem algum desses problemas chame o nutricionista. Ele lhe dará suporte e ajudará a resolver o problema.

O Papel dos Irmãos e Irmãs Mais Velhos no Gerenciamento da Dieta

As crianças mais velhas da família, assim como a criança com galactosemia, devem aprender sobre a dieta assim que tiverem idade suficiente para entender. Os irmãos mais velhos devem ser incentivados a ajudar a criança com a doença durante as refeições, assim eles tornam-se familiarizados com os alimentos permitidos e excluídos. Certifique-se que eles entendam a importância da dieta para a saúde de seu irmão ou irmã. Os irmãos sem a doença devem ser ensinados a não sentirem pena da criança com galactosemia. Trate a criança galactosemia o mais natural possível.

Outros Cuidadores e Suporte Nutricional

Explique a galactosemia para seus parentes, amigos, cuidadores de seu filho(a), babás, e todos professores. Diga a todos para não sentir pena de seu filho(a) e não dê “só um pouquinho” de qualquer alimento que não seja permitido. Enfatize o que pode acontecer se seu filho(a) não seguir a dieta.

Sua criança durante a doença

Uma temperatura maior que 37.5°C aferida na boca, ou maior que 38°C aferida de forma retal é febre. Durante a febre a taxa de utilização dos alimentos pelo corpo para formação de energia aumenta. Se uma energia extra não for suplementada durante a doença, o corpo começará a quebrar as proteínas musculares e as reservas lipídicas para a obtenção de energia. Para as crianças galactosêmicas em especial, a quebra de tecidos corporais precisa ser prevenida uma vez que isso liberará muita GAL na corrente sanguínea. A GAL é transformada em glactonato, gal-1-P e galactitol, o que prejudicará seu filho.

Dê alimentação extra para seu filho durante períodos de febre. Entretanto, alimentar uma criança doente pode ser difícil. Frequentemente a criança doente perde o apetite. A febre pode também promover náuseas e vômitos. A criança pode desidratar muito facilmente também, devido às altas temperaturas corporais e à baixa ingestão de líquidos.

Chame o seu pediatra imediatamente se seu filho(a) tiver febre. Pergunte sobre a medicação indicado ao caso e sobre a ingestão de líquidos para prevenir desidratação. Aqui estão algumas sugestões no caso de seu filho(a) ter febre:

- Não force a alimentação ou o uso das fórmulas isentas de lactose, especialmente se a sua criança estiver nauseada ou vomitando. Bolachas de água e sal podem ser o único alimento que ele provavelmente comerá.
- Ofereça soros de hidratação, refrigerantes, chá, sucos de frutas permitidas adoçados com açúcar.
- Congele algumas dessas bebidas e ofereça frequentemente na forma de gelinho, assim você estará fornecendo alguma energia e prevenindo a desidratação.
- À medida que o apetite de sua criança melhorar, retorne gradualmente ao plano alimentar habitual.

Galactosemia: uma desordem hereditária

Galactosemia ocorre em aproximadamente 1 pra cada 20.000 nascidos vivos no estado de São Paulo. Em afro-americanos que possuem a doença, a gravidade é usualmente menor, o que significa que o corpo consegue processar um pouco de galactose. A galactosemia é uma doença genética herdada tanto do pai quanto da mãe, assim como outras características como a cor dos olhos e da pele. A informação genética, que determina as características de cada pessoa é carregada em pares de genes em cada célula do corpo. Esses genes servem como padrões que direcionam o corpo a realizar diversas funções, inclusive a função de fazer enzimas, como a GALT.

Os pais da criança com galactosemia tem um gene normal ( ) e um gene alterado ( ). Cada um de seus filhos pode ter uma de quatro configurações gênicas.

Figura: Hereditariedade de Galactosemia

Uma criança que recebe o tipo gênico “A” herda dois genes normais (□ □). O seu corpo fará enzimas o suficiente para usar toda a galactose. Ele passará um gene normal para todos seus filhos.

A criança que receber o tipo gênico “B” ou “C” herdará um gene normal (□) e um gene com galactosemia (■). Seu corpo fará enzima GALT o suficiente para usar toda a galactose normalmente, mas ela passará o gene da galactosemia para seus filhos. Uma pessoa com esse tipo gênico é chamada de “portadora”. Ser um portador não afeta a saúde da pessoa. Vocês, pais de crianças com galactosemia são portadores. Os irmãos e irmãs de seu filho com galactosemia podem ser portadores também.

A criança com o tipo gênico “D” tem galactosemia causada por dois genes galactosêmicos (■ ■), um proveniente da mãe e outro do pai. Seu corpo não será capaz de usar a galactose da comida normalmente. Ela também passará o gene da galactosemia para todos os filhos que tiver. O seu filho que tem galactosemia possui o tipo gênico “D”.

Um olhar no futuro

O não seguimento da dieta restrita em galactose pode levar a um dano no sistema nervoso em qualquer idade. O seu médico lhe dirá que seu filho precisará seguir a dieta por toda a vida. Se você tem uma filha com galactosemia, ela precisa saber que mulheres galactosêmicas raramente engravidam.

Planejamento Familiar

A chance de dois portadores de galactosemia terem um filho galactosêmico é de 1 em 4, ou 25% para cada gravidez. A chance de dois portadores terem filhos portadores é de 50% para cada gravidez.

Na figura acima você pode ver que uma mãe e um pai que são portadores do gene da galactosemia podem passar para seus filhos um gene normal e um galactosêmico. Esses bebês não têm galactosemia, mas eles são portadores de gene de galactosemia. Cada vez que um bebê é concebido por pais portadores, existe exatamente a mesma probabilidade (1 em 4 ou 25%) de terem filhos galactosêmicos.

Antes de ter mais filhos, um casal que tem um filho galactosêmico deve pensar seriamente sobre as responsabilidades especiais que deverão, caso seu outro filho nasça galactosêmico também. Aconselhamento genético é recomendado para revisar os riscos e para discutir várias opções reprodutivas que estão disponíveis antes e durante a gravidez.

Se você decidir ter outra criança, dê ao menos tempo para se ajustar às necessidades especiais do primeiro filho. Esteja certa de que você aprendeu o manejo dietético de seu filho (a) com galactosemia antes de conceber outra criança.

Gravidez de mulheres com galactosemia

Geralmente, as mulheres que possuem galactosemia não conseguem ter filho. Em geral, aquelas que conseguem ter uma primeira gravidez não conseguem ficar grávidas novamente. Todas as crianças que nascerem de mães galactosêmicas serão portadores do gene da galactosemia. Como mostrado na figura abaixo, todas os filhos de mãe ou pai galactosêmico (■ ■) e mãe ou pai sem galactosemia (□ □) herdarão um gene normal (□) e um gene da galactosemia (■). Cada criança será, assim, uma portadora.

Tabela1: Dietas Restritas em Galactose

Os alimentos PERMITIDOS contêm menos de 5mg de galactose em cada 100g de alimento, os alimentos que devem ser LIMITADOS contêm de 5 a 20 mg de galactose em cada 100g de alimento e os alimentos que devem ser EXCLUÍDOS contêm mais de 20mg de galactose em 100g de alimento.

Permitidos	Limitados	Excluídos
BEBIDAS Café, chá, vinho, bebidas carbonadas, bebidas que não contêm lactose, sucos de frutas permitidas, leites e fórmulas isentas de lactose	Suco de maçã Suco de laranja Suco de pêra	Leite e derivados, bebidas que contêm leite ou lactose, suco de mamão, iogurtes, yacult, suco de melancia
PÃES E CEREAIS Pães, bolachas salgadas, cereais, bolachas que não contem leite ou lactose		Muffin, bolachas doces, panquecas, waffle, biscoitos feitos com leite ou que contenham lactose
QUEIJOS E DERIVADOS Nenhum		Todos os tipos de queijo, cremes, cream cheese, requeijão, creme de leite.

SOBREMESAS Bolos, tortas e cookies feitos sem leite e com ingredientes permitidos, gelatina, sorvetes e pudins feitos sem leite ou creme de leite		Qualquer doce que contenha chocolate, leite, leite de côco, sorvetes, pudins, bolos normais, cookies normais, bolachas que contenham leite ou derivados em seus ingredientes.
OVOS Todos		Omeletes, suflês, outros pratos que contenham leite.
GORDURAS Bacon Gordura animal Margarina sem leite Olhos vegetais	Manteiga	Cremes, creme de leite, doce de leite
FRUTAS E SUCOS Abacate Damasco Cerejas Uvas roxas Manga Nectarina Laranja	Suco de laranja Suco de maçã Suco de kiwi Maçã Banana Uvas verdes Melancia Pêssegos Abacaxi Morangos	Salada de frutas Amoras Mirtilho (blueberry) Figos Suco de uvas Limão Melão Mamão Tangerinas Suco de melancia Ameixas Cacau
GRÃOS Trigos, cevada, aveia, centeio, arroz, milho, macarrão, canjica, batata.		Semente de cacau e todos os grãos que contenham leite ou derivados do leite
LEGUMINOSAS, CASTANHAS E SEMENTES Amêndoas, castanha do Pará, côco, macadâmia, amendoim, castanhas		Feijão e ervilha – TODOS OS TIPOS Semente de abóbora Tofu Molho de soja fermentado (shoyo) Gergilim
CARNES, PEIXES E CARNE DE PORCO Todos os tipos de carnes		Preparação que levem molhos a base de leite, queijos, creme de leite e derivados
VEGETAIS E LEGUMES Alcachofra, aspargos, repolho, couve-flor, pepino, alface, cogumelos, mostarda, espinafre, broto de bambu, broto de feijão, acelga, vagem, couve, aipo, quiabo, salsa, rabanete, abobrinha	Brócolis, cenoura, cebola, pimentão, couve de Bruxelas, Berinjela, alho poró, picles, abóbora, inhame, chucrute, nabo	Tomate
INGREDIENTES Corantes caramelo Caldos feitos com água, Raiz forte Lactato Ácido Láctico Puro glutamato monossódico Pimentas Goma guar e goma arábica Molho inglês	Cacau, achocolatado, chocolate meio amargo, catchup, lactoalbumina, lactoglobulina, malte, acácia, agar, carragenina, goma de tragacanto, xantina	Caramelo, alimentos diet que contenham leite ou derivados, medicamentos, minerais ou vitaminas contendo lactose, hidrolisado proteico, ágata (moca), alguns suplementos de cálcio.