

Hernâni José Brochado Miranda Teixeira

Erros inatos do metabolismo mais frequentes em Portugal

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2012

Hernâni José Brochado Miranda Teixeira

Erros inatos do metabolismo mais frequentes em Portugal

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2012

Hernâni José Brochado Miranda Teixeira

Erros inatos do metabolismo mais frequentes em Portugal

Declaro que este trabalho foi realizado por mim e que todas as fontes utilizadas foram devidamente referenciadas na sua totalidade

(Hernâni Miranda Teixeira)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau
de Mestre em Ciências Farmacêuticas

SUMÁRIO

Os erros inatos do metabolismo referem-se a um grupo de doenças geneticamente determinadas, decorrentes da deficiência numa via metabólica envolvida na síntese, no transporte ou na degradação de uma substância. O aspecto clínico que cada uma destas doenças pode tomar resulta da acumulação do substrato de uma reacção, da falta de produto dessa mesma reacção ou da acumulação de uma substância originada a partir de uma via metabólica alternativa.

Estes erros, apesar de isolados apresentarem uma pequena incidência sobre a população, quando descritos em conjunto (cerca de quinhentos conhecidos), tornam-se mais comuns, apresentando taxas de incidência na ordem de 1 caso a cada 1000 nascimentos. Sabe-se hoje que a rápida detecção destas doenças é que determina a gravidade que estas podem assumir, pelo que os programas de triagem neonatal estão em constante evolução no que respeita ao aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico, para que os resultados dos tratamentos sejam cada vez mais expressivos.

Este trabalho aborda inicialmente os erros inatos do metabolismo de uma forma genérica, dando depois lugar à análise das três desordens metabólicas mais frequentes em Portugal: a deficiência na enzima acil-CoA desidrogenase de cadeia média, a fenilcetonúria e a deficiência na enzima 3-metilcrotonil carboxilase. São descritas para as três as deficiências que ocorrem nas vias metabólicas que essas enzimas catalisam, os aspectos clínicos da doença que originam, as suas formas de detecção e as estratégias terapêuticas que estão actualmente disponíveis.

ABSTRACT

Inborn errors of metabolism refer to a group of genetically determined diseases, resulting from a deficiency in a metabolic pathway involved in the synthesis, transport or degradation of a substance. The clinical aspect that each of these diseases can take results from the accumulation of the substrate reaction, the lack of product of the same reaction, or the accumulation of a substance originated from an alternative metabolic pathway.

These errors, although isolates showed a small impact on the population, when described together (about five hundred known), become more common, with incidence rates in the order of 1 case per 1000 births. It is now known that early detection of these diseases, determines the severity of the disease can take, so the neonatal screening programs are constantly evolving in relation to improved diagnostic techniques, to treatment outcomes are increasingly more expressive.

This work first discusses the inborn errors of metabolism in a generic way and then gives way to analysis of the three most common metabolic disorders in Portugal: the deficiency in the enzyme medium chain acyl-CoA dehydrogenase, phenylketonuria and deficiency in the enzyme 3-methylcrotonyl carboxylase. For the three are described the deficiencies that occurs in metabolic pathways that these enzymes catalyze, the clinical aspects of disease that originate, their forms of detection and the therapeutic strategies that are currently available.

DEDICATÓRIAS

... a todos aqueles que lutam contra um erro inato do metabolismo.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido tão gratificante sem aqueles que me ajudaram a realizá-lo. Por isso mesmo agradeço toda a atenção e apoio aos meus pais, à minha irmã, à Filipa e a todos os meus amigos.

Agradeço à Professora Doutora Carla Sousa e Silva e à Professora Doutora Carla Moutinho o inegável profissionalismo, disponibilidade e atenção com que orientaram este trabalho.

Agradeço também à Doutora Laura Vilarinho, (Unidade de Rastreio Neonatal do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge) pelo material dispensado.

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	1
1.	Breve Resenha Histórica	1
2.	Erros Inatos do Metabolismo em Portugal	3
3.	Classificação dos Erros Inatos do Metabolismo.....	3
4.	Detecção dos Erros Inatos do Metabolismo	5
II.	DEFICIÊNCIA NA ENZIMA ACIL-CoA DESIDROGENASE DE CADEIA MÉDIA (DADCM)	10
1.	Via metabólica envolvida	10
2.	Fisiopatologia	13
3.	A enzima ADCM.....	14
4.	Aspectos clínicos	14
5.	Detecção	15
6.	Tratamento.....	16
III.	FENILCETONÚRIA.....	18
1.	Via metabólica envolvida	19
2.	Fisiopatologia	21
3.	A enzima FAH.....	23
4.	Aspectos clínicos	23
5.	Detecção	24
6.	Tratamento.....	25
IV.	DEFICIÊNCIA NA ENZIMA 3-METILCROTONIL-CoA CARBOXILASE....	27
1.	Via metabólica envolvida	27
2.	Fisiopatologia e aspectos clínicos.....	28
3.	A enzima 3-MCC	30
4.	Detecção	31
5.	Tratamento.....	32
V.	CONCLUSÃO.....	34
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Transporte de acil-CoA para o interior da mitocôndria.....	11
Figura 2 - β - oxidação mitocondrial dos ácidos gordos.....	12
Figura 3 - Degradação da fenilalanina em tirosina, por acção da FAH.....	19
Figura 4 - Via principal de degradação completa da fenilalanina.....	20
Figura 5 - Processo de degradação da leucina.....	28

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Algumas mutações referentes ao gene *MCCA* e suas consequências.....30

Tabela 2 - Algumas mutações relativas ao gene *MCCB* e suas consequências.....31

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a. - aminoácidos

ACADM - gene *ACADM* (do inglês, *acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 medium chain*)

ADCM - acil-CoA desidrogenase de cadeia média

BH₄ - tetra-hidrobiopterina (do inglês, *tetrahydrobiopterin*)

CACT - carnitina-acilcarnitina translocase

CAT-1 - carnitina palmitoiltransferase I

CAT-2 - carnitina palmitoiltransferase II

CG - cromatografia gasosa

CL - cromatografia líquida

CoA - coenzima A

DADCM - deficiência na acil-CoA desidrogenase de cadeia média

DMCC - deficiência na 3-metilcrotonil-CoA carboxilase

EIM - erro inato do metabolismo

EM - espectrometria de massa

EM/EM - espectrometria de massa *tandem*

FA - fenilalanina

FAH - fenilalanina-hidroxilase

FCU - fenilcetonúria

3- HIV - ácido 3-hidroxi-isovalérico

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)

kb - quilobase

kDa – quiloDalton

3-MCC - 3-metilcrotonil-CoA carboxilase

MCCA - (gene *MCCA*, do inglês, *methylcrotonoyl-CoA carboxylase alpha*)

MCCB - (gene *MCCB*, do inglês, *methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta*)

3-MCG - 3-metilcrotonilglicina

OM - β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos

PAH - gene *PAH* (do inglês, *phenylalanine hydroxylase*)

STALN-1 - sistema de transporte de aminoácidos longos neutros

I. INTRODUÇÃO

Este trabalho começa por dar uma panorâmica geral sobre erros inatos do metabolismo (EIMs), focando-se depois naqueles que são mais frequentes no nosso País. Vão ser abordados, de uma forma genérica, temas comuns a todos os EIMs, como por exemplo, a sua classificação ou a sua detecção, recuando também no tempo para que se perceba como este longo processo de investigação evoluiu e, conseqüentemente, se descobriram novos EIMs, novos tratamentos, novas e mais eficientes formas de detecção e diagnóstico. Aborda-se seguidamente, e de forma mais aprofundada, aqueles cuja incidência em Portugal é maior. Assim, por rastreio de 316.243 nascimentos de crianças portuguesas, realizado entre 2005 e 2009 concluiu-se que os três EIMs mais comuns no nosso país são a deficiência na acil-CoA desidrogenase de cadeia média (DADCM), a fenilcetonúria (FCU) e a deficiência na 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (DMCC) (Vilarinho *et al*, 2010). Neste trabalho vão ser aprofundados os três EIMs anteriormente mencionados, as vias metabólicas afectadas por estas desordens, os seus aspectos clínicos, as suas opções de tratamento e as técnicas de rastreio.

1. Breve Resenha Histórica

A definição clássica de erros inatos do metabolismo tem sido, ao longo dos anos, entendida como uma doença genética causada, numa fase inicial, pela alteração de um gene específico da qual resulta uma deficiência na actividade de uma enzima específica, originando um distúrbio bioquímico nas células e órgãos humanos (Xu *et al*, 2001). Os principais problemas ocorrem normalmente por erros nas vias catabólicas e de síntese de hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos gordos, purinas e pirimidinas, porfirinas, esteróides, lípidos e ácidos biliares, ou então, por erros correspondentes aos processos envolvidos na síntese, captação ou utilização de co-factores essenciais para o funcionamento dessas mesmas vias (Seymour *et al*, 1997).

Antes de se compreenderem as vias metabólicas, o diagnóstico de erros inatos do metabolismo era, normalmente, feito recorrendo à observação de anomalias, como por exemplo, a urina escurecida, característica de indivíduos com o fenótipo da alcaptonúria, descoberta e caracterizada por Archibald Garrod, em meados de 1900, como o primeiro erro metabólico inato. Estes erros eram inicialmente reconhecidos em indivíduos que, após o nascimento, ficavam gravemente doentes ou nasciam

dismórficos ou com visíveis transtornos mentais; estes distúrbios foram assim entendidos como herdados, após uma observação da recorrência da doença nos membros familiares do indivíduo em causa (Jones e Bennett, 2002).

Garrod interessou-se pelas questões etiológicas e clínicas da alcaptonúria e os seus estudos bioquímicos estabeleceram a verdadeira natureza da doença: era congénita, possivelmente hereditária, e não contagiosa como se pensava na altura. Além da alcaptonúria, Garrod também se interessou por outras desordens como o albinismo, cistinúria, porfíria e pentosúria. As deduções de Garrod poderiam tê-lo introduzido no campo da genética e da bioquímica, no entanto, o seu trabalho pioneiro foi ignorado por vários anos por vários geneticistas e bioquímicos. O facto do trabalho de Garrod não ter sido seguido teve várias razões como: as suas observações serem consideradas isoladas e não como as primeiras de uma série de complexas alterações metabólicas que viriam a ser descobertas anos depois; recorria a abordagens que combinavam ideias e métodos oriundos de uma série de fontes, tais como a genética, a patologia e a bioquímica, e isso era uma forma de trabalho que não foi facilmente compreendida pelos cientistas da época; os princípios da genética ainda não tinham começado e mesmo o termo *genética* ainda estava para ser inventado. Na ordem dos desenvolvimentos científicos, as descobertas de Garrod aconteceram muito cedo para serem apreciadas e principalmente compreendidas (Dronamraju, K., 1992).

Já em 1941, Beadle e Tatum propuseram a teoria “um gene – uma enzima”; nesta teoria diziam que uma unidade indivisível da hereditariedade chamada gene seria responsável pela presença e actividade de uma determinada enzima ou proteína. Assim, os diagnósticos começaram a ser direccionados para os genes alterados ou em falta que produziam as enzimas deficientes. Antes desta descoberta, apenas as formas graves de erros inatos eram diagnosticadas e só mais recentemente é que se tem vindo a entender que existe uma continuidade relacionada de formas graves a leves para quase todos os defeitos genéticos conhecidos até hoje (Jones e Bennett, 2002).

2. Rastreio dos erros inatos do metabolismo em Portugal

O Programa de Triagem Neonatal Português foi criado em Portugal no final da década de 1970 pelo Ministério da Saúde. Ao longo destes anos, tem acompanhado as evoluções internacionais ao nível de técnicas de rastreio, tendo começado com o rastreio da fenilcetonúria e do hipotiroidismo congénito. Na actualidade, o nosso programa de triagem neonatal é realizado em todo o país, num único laboratório que processa mais de 400 amostras diárias de cerca de 25 erros inatos do metabolismo.

Nos últimos anos, a introdução da espectrometria de massa *tandem*, representou um ponto de viragem na triagem neonatal. Esta técnica permite um diagnóstico simultâneo de várias doenças realizado num único teste baseado na avaliação dos perfis de aminoácidos e de acilcarnitinas. A eficácia deste programa tem vindo a demonstrar a importância da identificação precoce e o tratamento de crianças com distúrbios metabólicos que antigamente poderiam passar despercebidos antes da ocorrência de danos clínicos irreversíveis. Em Portugal são analisados os EIMs relativos às desordens de aminoácidos (1:5.856), desordens no ciclo da ureia (1:79.061), desordens de ácidos orgânicos (1:13.177) e desordens relativas à β -oxidação de ácidos gordos (1:6325) (Vilarinho *et al*, 2010).

3. Classificação dos Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo correspondem a 10 % de todas as doenças genéticas e, apesar de prevalecer a ideia de que são doenças raras individualmente, em conjunto são bastante frequentes apresentando uma incidência de 1:1000 recém-nascidos vivos e, se não diagnosticadas e tratadas atempadamente, muitas das crianças afectadas serão internadas por longos períodos de tempo necessitando de cuidados intensivos. Estas situações provocam um grande impacto nas famílias em causa e na prestação dos cuidados de saúde (Seymour *et al*, 1997; Amâncio *et al*, 2007).

Como se tratam de alterações metabólicas bastante distintas, os EIMs possuem várias classificações, sendo que a que se apresenta mais didáctica e com maior aplicação clínica é a sugerida por Saudubray. Este considera três grandes grupos, tendo em conta o ponto de vista terapêutico (Saudubray *et al*, 2006):

Grupo 1 - *Desordens que originam intoxicação*: este grupo inclui erros inatos do metabolismo intermediário que levam a uma intoxicação aguda ou progressiva, causada pela acumulação de compostos tóxicos que originam um bloqueio metabólico. Neste grupo inserem-se os erros inatos do catabolismo de aminoácidos (fenilcetonúria, tirosinemia, entre outros), a maioria das acidemias orgânicas (como por exemplo, ácido metilmalónico, ácido propiónico), defeitos no ciclo da ureia, intolerância aos açúcares (galactosemia e intolerância hereditária à frutose), intoxicação por metais (doença de Wilson, hemocromatose e doença de Menkes) e porfírias.

Todas as desordens deste grupo compartilham semelhanças clínicas, sendo a maioria delas tratáveis por remoção de emergência da toxina recorrendo a dietas especiais, procedimentos extracorpóreos ou a farmacoterapia.

Embora a fisiopatologia seja um pouco diferente, os erros inatos da síntese e catabolismo de neurotransmissores (monoaminas, ácido gama amino-butírico, glicina) e os erros inatos da síntese dos aminoácidos (serina, glutamina e prolina/ornitina) também podem ser incluídos neste grupo uma vez que partilham muitas características.

Grupo 2 – *Desordens que envolvem o metabolismo energético* – este grupo refere-se a erros inatos do metabolismo que, pelo menos parcialmente, têm origem numa deficiência na produção de energia ou na utilização da mesma por parte do fígado, miocárdio, músculos, cérebro e outros tecidos. Este grupo pode ser dividido em distúrbios da energia mitocondrial e citoplasmática, apesar dos primeiros serem mais graves pois provocam acidemia láctica congénita (por defeitos no transportador do piruvato, na piruvato carboxilase, na piruvato desidrogenase e no ciclo de Krebs) e distúrbios na cadeia respiratória mitocondrial.

Os distúrbios da energia citoplasmática incluem defeitos na glicólise, no metabolismo do glicogénio, na gluconeogénese e no hiperinsulinismo. Mais recentemente, foram também descobertos problemas no metabolismo da creatina e erros inatos que envolvem a via das pentoses fosfato.

Grupo 3 – *Desordens que envolvem moléculas complexas* – este grupo envolve organelos celulares e inclui as doenças que perturbam a síntese ou o catabolismo de moléculas complexas. Os sintomas são permanentes, progressivos e sem relação com a ingestão de alimentos. Todas as doenças relacionadas com deposição lisossomal, doenças peroxissomais, erros na síntese do colesterol, distúrbios na distribuição e

processamento celular e síndrome de glicoproteínas com deficiência em hidratos de carbono pertencem a este grupo (Saudubray *et al*, 2006).

4. Detecção dos Erros Inatos do Metabolismo

Os EIMs podem-se evidenciar em qualquer altura e de várias formas diferentes. Comumente, a sua detecção pode acontecer (Leonard e Morris, 2000):

- Durante a gravidez: mulheres que, por exemplo, estão grávidas de um feto com deficiência na 3-hidroxiacil-CoA de cadeia longa têm um risco elevado de desenvolver complicações frequentes como hemólise, elevação dos níveis das enzimas hepáticas, baixa contagem de plaquetas e outras menos frequentes, como esteatose hepática aguda e hiperémese. Contudo, na maioria das mulheres grávidas estas complicações não são relacionadas com o erro inato.
- No momento do nascimento: observação de anomalias presentes no momento do nascimento ou logo após. Podem ser detectados distúrbios como convulsões, hipotonia grave, ascite e síndromes dismórficas. Estes EIMs são frequentemente mal diagnosticados como asfixia perinatal em bebés que apresentam disfunções neurológicas, especialmente aqueles com acidemias lácticas congénitas e dependência de piridoxina.
- Morte súbita: defeitos na oxidação dos ácidos gordos, especialmente nos de cadeia longa, podem levar à paragem respiratória, bloqueio cardíaco ou arritmias. Na maioria dos casos a autópsia revela um excesso de gotículas de gordura no fígado ou no tecido cardiovascular. No entanto, as amostras para efectuar testes metabólicos deverão ser recolhidas o mais rapidamente possível após a morte, sem esperar pela autópsia.
- Após um período assintomático: a maioria dos bebés com erros inatos de metabolismo nascem a termo e inicialmente parecem estar bem de saúde. No entanto, algum tempo após o nascimento a patologia agrava-se e começa a fazer-se notar pois, mesmo que os bebés não recebam alimentação oral, ocorrem reacções de catabolismo o que leva à acumulação de metabolitos tóxicos. Numa

fase inicial suspeita-se que o bebé seja séptico, mas o aparecimento de encefalopatia revela a possibilidade de se tratar de um erro inato.

O início agudo de um EIM num recém-nascido pode ser dividido em três categorias clínicas principais: acidemia por causas metabólicas, hiperamonemia e hipoglicemia, apesar desta última não ser tão comum como as primeiras. A acidemia é definida como um baixo valor de pH, devido a um excesso de ácido (H^+) ou a um défice de base (HCO_3^-), que ocorrem por aumento da produção de ácidos fixos ou não voláteis, ou ainda, por redução da capacidade tampão.

O intervalo aniónico (usado no diagnóstico diferencial da acidemia metabólica e que se calcula através da fórmula: $\text{intervalo aniónico} = [Na^+] - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$) deve ser calculado para elucidar se a acidemia é causada por uma acumulação de ácidos orgânicos ou por uma diminuição de bicarbonato, sendo muito importante para estabelecer o diagnóstico de EIMs suspeitos. A abordagem mais comum para a acidemia em recém-nascidos consiste em corrigir a acidez por administração de bicarbonato. No entanto, se a acidemia for causada por um EIM não vai responder ao bicarbonato, salvo raras exceções, pelo que neste caso o tratamento eficaz passa por corrigir directamente a causa da acidemia, tal como diminuir o excesso de produção endógena de ácidos específicos (Banta-Wright e Steiner, 2003).

Relativamente à hiperamonemia, sabe-se que no período neonatal um nível normal de amónia é inferior a $50 \mu\text{mol/L}$, pelo que níveis entre os 70 e os $100 \mu\text{mol/L}$ devem ser estudados em conjunto com outros parâmetros clínicos suspeitos. Num recém-nascido de termo, uma hiperamonemia nas primeiras 24 horas não apresenta qualquer risco, mas após esse tempo e se não for detectada, começam a aparecer sintomas como letargia, hipotonia, vómitos frequentes e hiperpneia. Como a amónia quando presente em concentrações elevadas é uma toxina para o Sistema Nervoso Central, coloca rapidamente o bebé em risco de vida, pelo que se não for identificada atempadamente o recém-nascido ficará com sequelas neurológicas irreversíveis (Banta-Wright e Steiner, 2003). Os recém-nascidos que apresentam hiperamonemia durante o primeiro dia de vida são geralmente prematuros, ou então, recém nascidos cujo tempo de gestação foi o normal mas que apresentam uma deficiência na piruvato carboxilase.

Um nível de amónia elevado associado à prematuridade é conhecido como hiperamonemia transitória do recém-nascido ou hiperamonemia secundária. Uma hiperamonemia que ocorre após as primeiras 24 horas de vida é caracteristicamente

considerada como primária e encontra-se relacionada principalmente com defeitos no ciclo da ureia, sendo notada através de alcalemia respiratória causada por uma hiperpneia; ainda assim, uma hiperamonemia secundária pode também estar relacionada com outros erros metabólicos, como acidemia orgânica ou desordens na oxidação dos ácidos gordos, sendo que a chave para a diferenciação destes quadros clínicos passa pela presença ou não de acidemia, cetose ou hipoglicemia (Banta-Wright e Steiner, 2003).

Após estudos laboratoriais iniciais, condições como acidemia metabólica e hiperamonemia são pistas fundamentais para sinalizar a necessidade de uma nova avaliação clínica por parte de um especialista em erros metabólicos, notando que a ausência destes transtornos não exclui o diagnóstico de EIM (Banta-Wright e Steiner, 2003).

Compreende-se assim que a melhor forma para conseguir um possível tratamento neste tipo de doenças será começar por tentar obter suspeitas iniciais e diagnósticos oportunos acerca da desordem que se desconfia poder estar a desenvolver-se. Isto é possível através de estudos laboratoriais de rotina que muitas vezes sugerem a suspeita (Smith e Harding, 2006).

Estes estudos, denominados de triagem neonatal de rotina (que segundo Sharrard e Pollitt, são a aplicação sistemática de um teste ou inquérito para identificar os indivíduos de risco suficiente para beneficiarem de novas investigações ou medidas preventivas directas) podem sugerir uma doença específica, mesmo antes do início dos sintomas no recém-nascido (Sharrard e Pollitt, 2007). A triagem neonatal é também uma importante medida de saúde pública que visa o diagnóstico precoce e o tratamento do recém-nascido afectado, de forma a reduzir a mortalidade e a morbilidade associadas a estas doenças. É um sistema que envolve triagem, diagnóstico, tratamento, acompanhamento e educação sobre como lidar com a doença, que deverá ser institucionalizado e sustentado dentro dos sistemas de saúde públicos (Padilla *et al*, 2010).

A triagem neonatal teve início com o diagnóstico da fenilcetonúria em 1962, no estado de Massachusetts, Estados Unidos da América, ao passo que em Portugal, o chamado Programa de Triagem Neonatal Português começou em 1979, também inicializado com o diagnóstico da fenilcetonúria (Jones e Bennett, 2002; Vilarinho *et al*, 2010). Actualmente, as desordens incluídas na maioria dos programas de triagem neonatal têm de atender, essencialmente, aos seguintes critérios (Jones e Bennett, 2002):

- Ter uma incidência significativa na população sujeita ao rastreio;
- Estar clinicamente bem definido;
- Ter um fenótipo bioquímico bem conhecido;
- Ser causador de morbilidade/mortalidade significativas;
- Ser tratável e o tratamento melhorar os resultados clínicos;
- O teste deverá ser seguro, simples e sensível;
- Ter um teste confirmativo específico disponível;
- O teste, o tratamento e o resultado do tratamento deverão ser rentáveis relativamente ao não tratamento.

Várias técnicas diferentes que incluem testes bacteriológicos, cromatografia, imunoensaios e fluorimetria, entre outros, são actualmente usadas em laboratórios destinados à triagem dos erros inatos, e no final do século XX a grande promessa na área da detecção de EIMs respondia pelo nome de espectrometria de massa (EM) (Seymour *et al*, 1997), sendo hoje uma realidade. Esta técnica é a ferramenta ideal para a identificação de metabolitos, pois possui uma elevada especificidade na fragmentação de massas o que a torna no único mecanismo capaz na identificação de verdadeiros positivos para os compostos químicos e intermediários metabólicos (Jones e Bennett, 2000).

Os métodos cromatográficos são ideais no que diz respeito à separação de compostos de uma matriz biológica como o soro, mas sem a EM existe um problema na identificação dos mesmos, baseado no tempo de retenção; ou seja, uma identificação positiva não poderá ser considerada quando um composto desconhecido elui no mesmo tempo que um outro composto conhecido. Isto conduziu à introdução da EM acoplada à cromatografia gasosa (CG), o que possibilitou um equilíbrio ideal, em que basicamente se liga um sistema de cromatografia gasosa a um espectrómetro de massa, sendo que o primeiro separa e o segundo detecta. Os inconvenientes desta técnica são normalmente relacionados com a dificuldade em tornar um composto orgânico suficientemente volátil para separá-lo por CG ou ainda os tempos de separação muito elevados (pode chegar até 65 minutos no caso de uma análise efectuada a ácidos orgânicos na urina), que tornam esta técnica imprópria para rastreio de uma população inteira (Jones e Bennett, 2002).

Assim, nos últimos anos, a espectrometria de massa tem vindo a ser acoplada também à cromatografia líquida (CL), em que a CL separa os componentes e a EM serve como detector.

Posteriormente surge uma outra técnica, a espectrometria de massa *tandem* (EM/EM) que assenta no seguinte princípio: dois espectrómetros de massa em sequência originam uma combinação que permite que o aparelho procure simultaneamente um determinado ião, os produtos de fragmentação do mesmo, ou então, os dois ao mesmo tempo. Estes instrumentos têm a capacidade de ser usados com injeção directa ou acoplados a um sistema de cromatografia líquida se for necessária alguma separação. Em ambos os casos, os tempos de execução são significativamente mais curtos do que os verificados com técnicas de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*) ou CG/EM (Jones e Bennett, 2002).

A espectrometria de massa *tandem* é uma tecnologia muito específica e muito sensível mas como qualquer outra, também apresenta desvantagens: o custo inicial de um sistema destes é elevado e é necessário um elevado nível de conhecimento para operar o sistema, para preparar as amostras, bem como para interpretar os dados produzidos. Como em qualquer outro teste de triagem, também este necessita de testes de acompanhamento de diagnóstico (Jones e Bennett, 2002).

Também em Portugal já se recorre a esta técnica para o rastreio de EIMs desde 2005 (Vilarinho *et al*, 2010).

II. DEFICIÊNCIA NA ENZIMA ACIL-CoA DESIDROGENASE DE CADEIA MÉDIA

A deficiência na enzima acil-CoA desidrogenase de cadeia média (DADCM) é a desordem mais comum da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos (OM). Existem vários casos descritos na literatura e apesar da gravidade da doença, é frequente encontrarem-se indivíduos assintomáticos, principalmente entre os familiares dos casos estudados. O porquê da doença nunca se ter manifestado clinicamente nestes indivíduos deve-se a motivos genéticos ou ambientais.

O transporte e a oxidação mitocondrial dos ácidos gordos são um processo complexo que desempenha um papel importante na produção de energia durante períodos de jejum ou de *stress* metabólico. A enzima acil-CoA desidrogenase de cadeia média faz parte do processo da OM, juntamente com outras três enzimas: acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa, acil-CoA desidrogenase de cadeia longa e acil-CoA desidrogenase de cadeia curta; consoante o tipo de ácido gordo, cada uma destas enzimas é utilizada no primeiro passo da β -oxidação, analisada a seguir (Rhead, 2005; Jameson e Walter, 2010).

1. Via metabólica envolvida

A via metabólica onde ocorre esta desordem relaciona-se com o metabolismo dos lípidos.

Os ácidos gordos, quando libertados pelos adipócitos, são transportados pelo sangue ligados à albumina e a sua degradação é feita por uma via especial que se processa no interior das mitocôndrias.

Numa fase que precede essa via especial, a β -oxidação, os ácidos gordos são activados por conversão em acil-CoA, por acção das acil-CoA sintetases presentes na membrana externa da mitocôndria. No entanto, a membrana mitocondrial é impermeável às longas cadeias de acil-CoA, pelo que o processo, representado na Figura 1, continua da seguinte forma:

- O grupo acilo é transferido da CoA para um aminoácido, a carnitina, através da carnitina-aciltransferase I (CAT-1), que se encontra na membrana exterior da mitocôndria;

- Através desta reacção, a acilcarnitina formada bem como a carnitina em forma livre conseguem entrar para a membrana mitocondrial interna, por acção da carnitina-acilcarnitina translocase (CACT);
- Finalmente, o grupo acilo é transferido para uma coenzima da matriz mitocondrial por acção da carnitina-aciltransferase II (CAT-2).

Este é um processo primário no transporte de acil-CoA com 12 a 18 carbonos. A entrada deste tipo de moléculas com cadeias mais pequenas é geralmente independente da carnitina; estas atravessam a membrana interna da mitocôndria e tornam-se activas para os seus derivados CoA presentes na matriz.

A carnitina-aciltransferase I é importante para a regulação da oxidação dos ácidos gordos, pois a quantidade presente desta enzima regula a entrada de ácidos gordos na mitocôndria, determinando assim o fornecimento de substrato para a β -oxidação na matriz mitocondrial (Devlin, 2006).

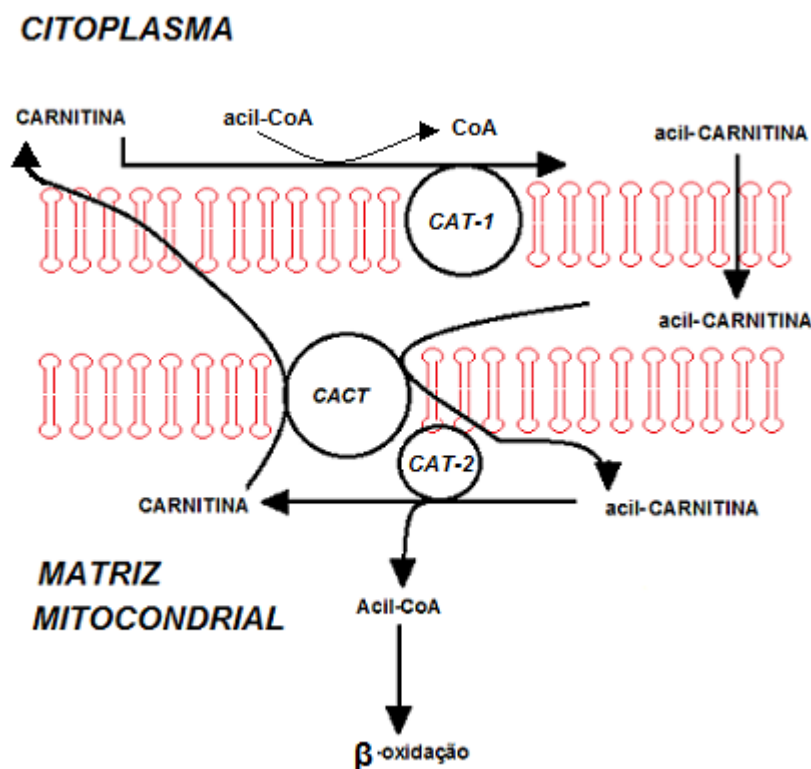


Figura 1 -Transporte de acil-CoA com 12 a 18 carbonos para o interior da mitocôndria (adaptado de Limketkai e Zucker, 2007).

Estando o acil-CoA formado na superfície interna da membrana mitocondrial interna, dá-se início à β -oxidação, representada na Figura 2, que ocorre como a seguir é descrito:

- O acil-CoA é oxidado pela acil-CoA desidrogenase, uma flavoproteína que usa FAD como aceitador de electrões; os produtos desta reacção são o enoil-CoA, com configuração *trans* entre o C2 e o C3, e formação de FADH₂, que transfere os seus electrões para as enzimas da fosforilação oxidativa que regenera o FAD.
- O segundo passo deste processo é a hidratação da ligação dupla que forma 3-hidroxiacil-CoA, que é depois oxidado a β -cetoacil-CoA, por acção da 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase ocorrendo formação de NADH.
- O último passo é a clivagem da cadeia da β -cetoacil-CoA pela β -cetoacil-CoA tiolase, originando acetil-CoA e um acil-CoA que foi diminuído em 2 carbonos.

Este acil-Coa mais curto fica assim pronto para um próximo ciclo, a iniciar pela acil-CoA desidrogenase (Devlin, 2006)

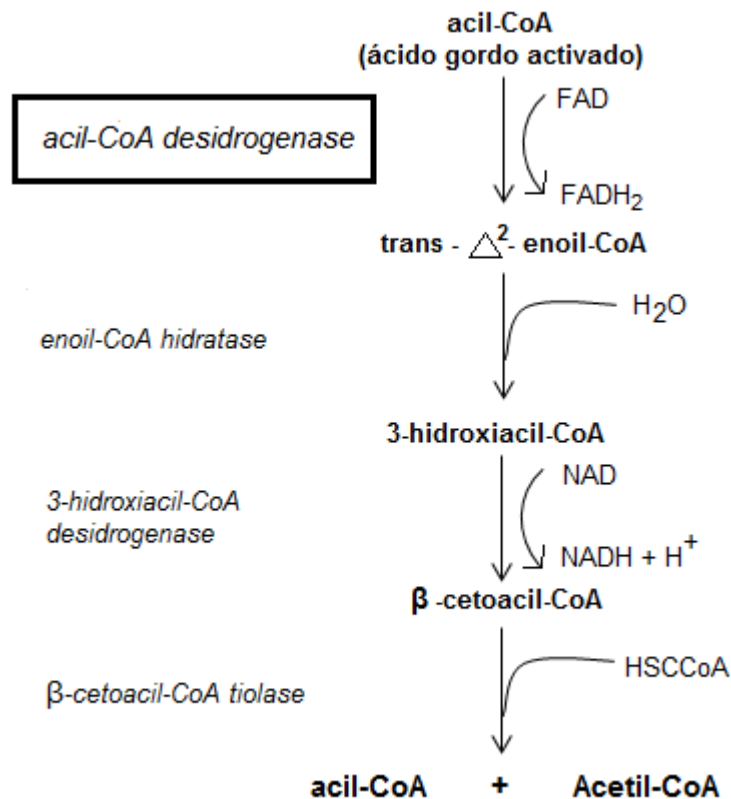


Figura 2 - β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos (adaptado de Devlin, 2006).

2. Fisiopatologia

A deficiência na acil-CoA desidrogenase de cadeia média é considerada uma doença autossómica recessiva e é a mais comum relacionada com a OM. A incidência é mais elevada em pacientes oriundos do norte europeu e, em Portugal, apresenta uma incidência de aproximadamente 1 caso em cada 9036 nascimentos (Vilarinho *et al*, 2010; Schatz e Ensenauer, 2010).

No normal estado de jejum, ocorre um abaixamento da concentração de glicose com uma queda paralela dos níveis de insulina; isto resulta na libertação de hormonas compensatórias e numa diminuição da utilização de glicose por parte dos músculos e dos tecidos periféricos. Inicialmente, a libertação de glicose resultante da quebra do glicogénio (glicogenólise) satisfaz as necessidades de energia, mas a partir de um determinado momento, a oxidação de gorduras para produção de energia torna-se cada vez mais importante para diminuir a dependência do glicogénio armazenado, que é limitado, e para originar a produção de corpos cetónicos que podem ser usados como uma alternativa à glicose, como fonte energética para o cérebro. Este processo é especialmente importante em crianças pequenas, cujos requisitos cerebrais de glicose são altos e cuja resposta fisiológica para períodos sem alimentação enteral é muito rápida, quando comparada com a de adolescentes ou adultos (Jameson e Walter, 2010).

Os ácidos gordos libertados pelos triglicérideos entram na mitocôndria onde posteriormente são submetidos à β -oxidação, um processo já descrito anteriormente. Os electrões libertados a partir deste processo entram na cadeia respiratória para a produção de ATP, enquanto a maioria da acetil-CoA produzida é convertida em corpos cetónicos a nível hepático.

Como já foi referido, as enzimas acil-CoA desidrogenase têm actividades que são específicas consoante o comprimento da cadeia: a enzima acil-CoA desidrogenase de cadeia média possui actividade máxima para ácidos gordos que contém entre 6 e 10 carbonos. No entanto, devido a uma possível sobreposição de cadeias, outras desidrogenases são capazes de oxidar os ácidos gordos de cadeia média, produzindo corpos cetónicos, o que explica porque é que alguns pacientes com DADCM podem ser capazes de tolerar o jejum nocturno. Porém, em períodos cujo aumento da necessidade de β -oxidação é maior, ocorre acumulação de derivados dos ácidos gordos de cadeia

média, bem como uma produção reduzida de acetil-CoA e de corpos cetónicos, originando a doença que aqui é abordada (Jameson e Walter, 2010).

3. A enzima ADCM

A enzima ADCM é uma flavoproteína homotetramérica com 44 kDa que é codificada pelo gene *ACADM* (do inglês, *acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 medium chain*). Este gene consiste em 12 exões que se estendem por cerca de 44 kb e localiza-se no braço curto do cromossoma 1 na posição 31 (1p31) entre os pares de base 76.190.042 e 76.229.354 (Andresen *et al*, 1997; GHR, 2011).

Já foram descobertas mais de 70 variantes deste gene, mas o defeito mais comum é uma mutação em que ocorre a substituição de adenina por guanina na posição nucleotídica 985 do exão 11 do gene (985A>G), o que resulta na substituição de glutamato por lisina no aminoácido 329; 80 % dos pacientes são homozigotos para esta mutação, enquanto que 18 % são heterozigotos compostos (Tran *et al*, 2007; Woo *et al*, 2011).

4. Aspectos clínicos

Como já foi referido, a β -oxidação desempenha um papel importante na produção de energia especialmente durante períodos de jejum, quando os depósitos de glicogénio terminam. Quando o paciente não está em jejum, o defeito genético pode ser clinicamente silencioso e o doente aparenta ser saudável (Wilhelm, 2006).

Os sintomas mais comuns deste EIM são a hipoglicemia hipocetónica recorrente, letargia, convulsões, episódios facilmente associados ao síndrome de Reye, coma, ou ainda, morte súbita (Rhead, 2005). Estes sintomas apresentam-se geralmente entre os 3 e os 24 meses, quando a criança passa pelo seu primeiro jejum prolongado associado a uma infecção recorrente, como por exemplo uma gastroenterite. A criança começa a apresentar sintomas de letargia, com náuseas e vómitos, progredindo rapidamente para coma. Se forem efectuados testes no momento, estes vão mostrar a evidência de disfunção hepatocelular, hipoglicemia, hipocetose e uma hiperamonemia leve a moderada. Se os níveis baixos de açúcar no sangue não forem verificados, a criança pode sofrer convulsões, danos neurológicos permanentes, edema cerebral e morte, no pior cenário (Jameson e Walter, 2010).

As manifestações desta doença também podem surgir apenas na adolescência ou já em idade adulta. Na literatura são descritos vários pacientes que foram diagnosticados apenas entre os 16 e os 45 anos de idade, em que no momento do diagnóstico apresentam frequentemente crises agudas que envolvem vários órgãos, manifestando-se por sintomas neurológicos, hepáticos, musculares ou cardíacos que originam descompensações metabólicas como acidemia, hiperamonemia, hiperlactacidemia e hipoglicemia. A rhabdomiólise (lise rápida de músculo esquelético devido a lesão no tecido muscular) é também um sintoma muito frequente (Schatz e Ensenauer, 2010).

5. Detecção

A triagem neonatal para a deficiência na ADCM é considerada desejável e já é feita em Portugal, uma vez que os efeitos nefastos que esta doença causa, podem ser evitados se for feita uma gestão adequada após o diagnóstico.

Na presença de sintomatologia sugestiva de DADCM, será necessário efectuar um diagnóstico diferencial, pois esta patologia apresenta sintomas comuns com outras deficiências da β -oxidação.

A inactividade da enzima leva a que os ésteres acil-CoA se acumulem na mitocôndria podendo ser metabolizados por outras vias, nomeadamente através da ω e (ω -1) oxidação. Este processo pode levar à produção, e posterior eliminação na urina, de ácidos dicarboxílicos de cadeia média (ácidos adípico, 5-hidroxi-hexanóico, 7-hidroxiocetanóico e dodecanedióico) (Wanders *et al*, 1999).

A conjugação de acil-CoA de cadeia média com a glicina, carnitina e/ou glucoronídeo geram também metabolitos como suberglicina, octanoilcarnitina, octanoilglucoronídeo, hexanoilglicina e fenilpropionilglicina, sendo estes dois últimos altamente específicos para o diagnóstico da DADCM. A presença de ácido *cis*-decenóico no plasma também desempenha um importante papel na detecção deste EIM.

O perfil de acilcarnitinas no plasma obtido por EM/EM para a DADCM é único, específico e caracterizado pelas elevadas concentrações de octanoilcarnitina, juntamente com concentrações elevadas de hexanoilcarnitina e decanoilcarnitina (Wanders *et al*, 1999). Estes pacientes também apresentam um rácio de octanoilcarnitina:decanoilcarnitina superior aos valores normais (Laforêt e Saban, 2010).

Outra estratégia proposta para a identificação desta doença assenta numa triagem neonatal para a mutação A985G do gene *ACADM*. No entanto, a procura de acilcarnitinas tornou-se na estratégia primária de diagnóstico, através da técnica de espectrometria de massa *tandem*, pois tem vindo a permitir o diagnóstico de todos os pacientes com DADCM independentemente da mutação subjacente ou do estado sintomático (Chace *et al*, 1997).

À exceção das acilcarnitinas, os restantes metabolitos são apenas detectados em períodos de doença aguda e muito raramente em períodos assintomáticos (Wanders *et al*, 1999). Quando perante um caso positivo usando a técnica EM/EM, é necessário o uso de testes adicionais, nomeadamente, uma análise à actividade da enzima ADCM nos leucócitos, fibroblastos, fígado, coração e músculo esquelético. Relativamente a este processo, um estudo de Hale *et al* em 1990, mostrou que os indivíduos com deficiência na ADCM geralmente apresentam menos de 10 % da actividade normal desta enzima (Matern e Rinaldo, 2005).

6. Tratamento

Actualmente existem algumas opções que podem ser utilizadas como tratamento para a DADCM. No entanto, a eficácia daquelas ainda não está publicada em estudos controlados e aleatórios (Tran *et al*, 2007).

A terapêutica mais importante no tratamento de distúrbios relacionados com a OM é, claramente, evitar o jejum prolongado de forma a garantir a supressão da lipólise, mantendo uma normal absorção de hidratos de carbono, de forma a estabilizar os níveis insulínicos.

Durante uma grave descompensação metabólica, que se faça acompanhar por hipoglicemia hipocetónica, deve ser imediatamente administrada glicose por via intravenosa a uma taxa de 7 mg/Kg/min, com monitorização contínua dos seus níveis plasmáticos. Este processo normaliza os níveis de glicose, diminuindo a produção de substâncias tóxicas (Wanders *et al*, 1999).

Uma cuidada gestão da dieta é também recomendada nestes pacientes, apesar de esta não estar ainda bem estabelecida (Wanders *et al*, 1999). Sabe-se no entanto que, ao contrário de pacientes que sofrem de desordens originadas por defeitos nas outras enzimas envolvidas na OM, em pacientes cuja DADCM esteja confirmada, sejam

sintomáticos ou não, não é necessária uma modificação da dieta, mas sim refeições regulares que evitem períodos de jejum, pelo menos durante os primeiros seis meses de vida. A alimentação por sonda e hidratos de carbono adicionais são dispensáveis, sendo no entanto necessário ter especial atenção em situações de doença ou de recusa de alimento, pois nestes casos a suplementação de hidratos de carbono (como por exemplo, maltodextrina) pode ser necessária (Spiekerkoetter *et al*, 2010).

Como já foi referido, esta desordem é caracterizada pelos baixos níveis de carnitina livre devido a perdas urinárias e à acumulação de acilcarnitinas, parecendo portanto benéfica a suplementação de carnitina que pode também funcionar como desintoxicante (Wanders *et al*, 1999). No entanto, um estudo recente abordou o papel da carnitina no tratamento deste EIM, tendo provado que a necessidade desta é apenas essencial quando perante casos de cardiomiopatia potencialmente letal. Ou seja, em pacientes com DADCM não é ainda muito claro se esta terapêutica é, ou não, realmente necessária, uma vez que numa consulta *online* feita a doentes com DADCM por Walter e seus colegas, apenas 36 % dos inquiridos responderam que usavam carnitina como suplemento (Spiekerkoetter *et al*, 2010).

III. FENILCETONÚRIA

A fenilcetonúria (FCU, conhecida no meio médico como PKU) é uma doença de transmissão autossómica recessiva e um dos exemplos mais conhecidos e estudados de EIMs, sendo o primeiro distúrbio provocado por um agente que se torna tóxico quando em altas concentrações, a fenilalanina (FA), tendo sido identificada como responsável por um atraso mental grave. No entanto, não foi apenas neste aspecto em que a FCU foi “a primeira”: esta doença foi também a primeira desordem metabólica a ter um tratamento bem sucedido, a primeira a ser controlada pela dieta e também a primeira a ser detectada pelos vários programas de triagem neonatal existentes no mundo (Cleary, 2010).

A FCU é a doença mais prevalente causada por um EIM, resultante de mutações no gene da fenilalanina hidroxilase (FAH). Até à década de 1960, a maioria das crianças nascidas com FCU sofreram graves deficiências mentais, acabando por passar toda a sua vida em instituições; as bases para a detecção precoce e posterior tratamento assentaram em três descobertas principais (Blau *et al*, 2010):

- Em 1930, Asbjorn Folling identificou os níveis elevados de FA no sangue (hiperfenilalaninemia) como a principal causa dos atrasos neuropsicológicos;
- Na década de 1950, Horst Bickel introduziu uma dieta pobre em FA como tratamento para a FCU;
- Em 1960, Robert Guthrie introduziu um teste de diagnóstico adequado para a triagem de hiperfenilalaninemia, o chamado teste do pezinho, ainda hoje utilizado.

A prevalência da FCU varia amplamente por todo o mundo. Nos Estados Unidos da América, a prevalência é de 1 caso a cada 15.000 nascimentos, sendo que na Europa este número aumenta para 1 caso a cada 10.000 nascimentos. No nosso país, a prevalência é de 1 caso a cada 12.163 nascimentos (Blau *et al*, 2010; Vilarinho *et al*, 2010).

1. Via metabólica envolvida

A tirosina e a fenilalanina estão intimamente relacionadas, uma vez que a primeira é produzida pela hidroxilação da FA, sendo o primeiro produto da degradação da mesma. Três quartos da FA ingerida é hidroxilada a tirosina, por acção da FAH numa reacção dependente do cofactor tetra-hidrobiopterina (BH_4 , do inglês *tetrahydrobiopterin*). Como é perceptível através da Figura 3, esta reacção ocorre apenas na direcção da formação de tirosina (Devlin, 2006).

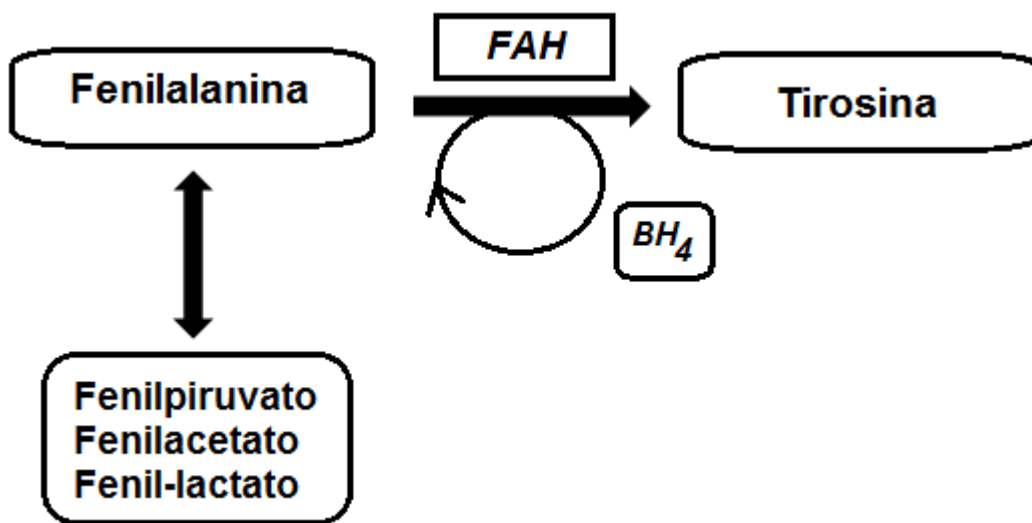


Figura 3 - Degradação da fenilalanina em tirosina, por acção da FAH (adaptado de Cleary, 2010).

Estando a tirosina formada, como mostra a Figura 4, a degradação continua por acção da tirosina aminotransferase formando *p*-hidroxifenilpiruvato, que seguidamente origina o ácido homogentísico numa reacção complexa que envolve descarboxilação, oxidação, migração da cadeia lateral de carbono e hidroxilação: o ácido ascórbico é necessário para, pelo menos, uma destas actividades, mas todas são catalisadas pela mesma enzima, a *p*-hidroxifenilpiruvato oxidase.

Seguidamente, ocorre formação de maleilacetoacetato que é isomerizado de *cis* a *trans* por uma isomerase, formando fumarilacetoacetato, depois convertido a fumarato (que pode ser utilizado no ciclo de Krebs) e acetato (que pode ser utilizado como acetil-CoA para a síntese de lípidos ou energia) (Devlin, 2006).

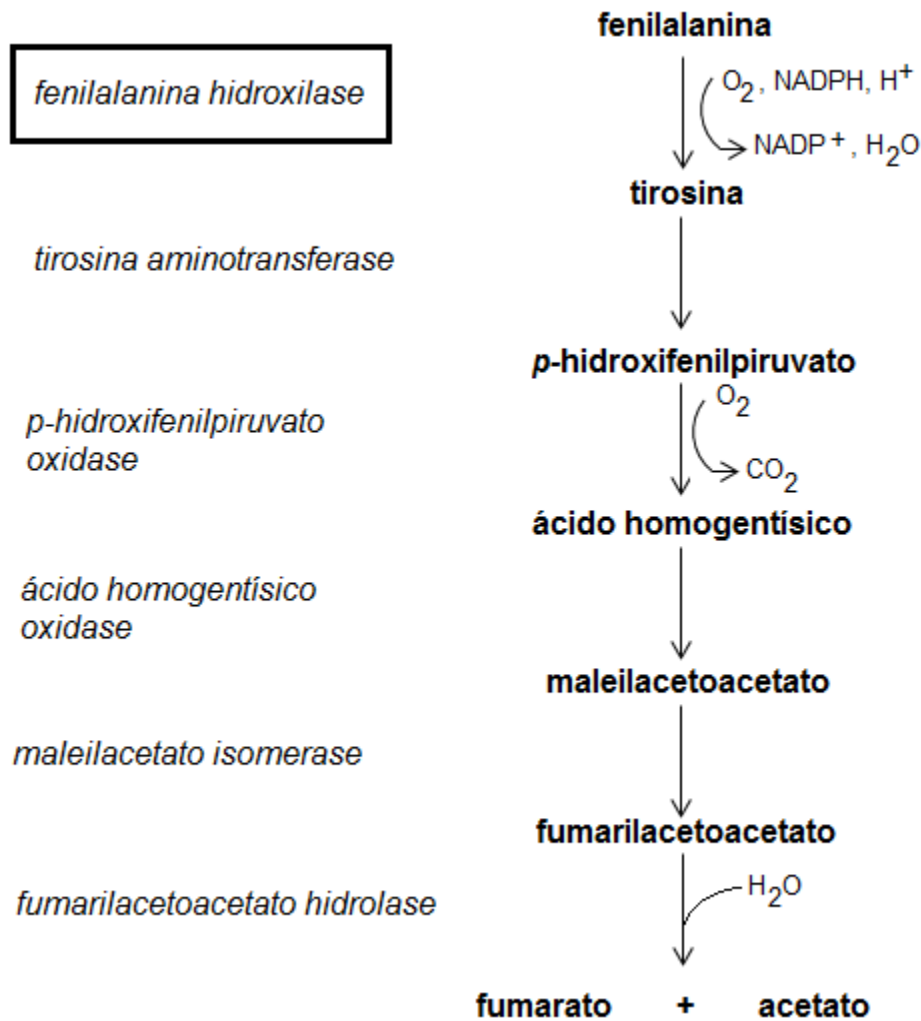


Figura 4 - Via principal de degradação completa da fenilalanina (adaptado de Visão Bioquímica).

Existe uma via alternativa para a metabolização da FA que é pouco importante quando em situações normais, mas que se torna na via mais utilizada quando a principal se encontra bloqueada. Esta via consiste na transaminação da fenilalanina a fenilpiruvato (o fenilpiruvato é uma fenilcetona, molécula esta que originou o nome “fenilcetonúria”) e seguidamente podem ocorrer duas situações (Vilarinho *et al*, 2006):

- A descarboxilação deste metabolito que origina fenilacetato, ou
- redução do mesmo produzindo fenil-lactato.

Como já foi referido, a FCU é causada pela deficiência na enzima FAH, mas também pode ocorrer por deficiências no cofactor BH₄ (Knaap e Valk, 2005). Como a primeira situação tem uma prevalência muito superior à segunda, neste trabalho apenas se vai considerar a deficiência na enzima FAH.

2. Fisiopatologia

A fenilalanina é um aminoácido essencial, presente na dieta humana. Normalmente é transformada em tirosina, que é utilizada na síntese proteica sendo o precursor imediato da melanina, dopamina, norepinefrina e epinefrina. O gene da enzima FAH é alvo de um grande número de mutações já relatadas na literatura, mutações estas que podem levar à ausência total de actividade da enzima ou resultar na presença de alguma actividade residual, estando esta situação directamente relacionada com a gravidade clínica da doença. Porém, o genótipo não é o único factor determinante do fenótipo, pelo que existem outros factores a ter em consideração na avaliação da gravidade da FCU (Knaap e Valk, 2005):

- O transporte de aminoácidos do sangue para o cérebro é um processo dinâmico, facilitado por nove transportadores de a.a. Um destes é o sistema de transporte de aminoácidos neutros (STAN-1) que se liga selectivamente aos a.a. neutros (valina, isoleucina, leucina, metionina, treonina, triptofano, tirosina, histidina e fenilalanina). A ligação do STAN-1 a um aminoácido neutro ocorre por um processo competitivo e este transportador excreta um aminoácido por cada a.a. que entra no cérebro. Em concentrações fisiológicas normais de aminoácidos neutros, o STAN-1 encontra-se quase totalmente saturado. Ele apresenta afinidades diferentes para cada um dos aminoácidos, sendo a fenilalanina o a.a. para o qual ele tem maior afinidade e a que se liga mais fortemente. Por este motivo, as altas concentrações sanguíneas de fenilalanina em doentes com FCU aumentam a absorção desta pelo cérebro, reduzindo a absorção dos outros a.a. através de dois mecanismos (Groot *et al*, 2010):
 1. Primeiro, a absorção de outros a.a. é reduzida devido à inibição competitiva por parte da FA.

2. Segundo, a troca a nível cerebral entre outros aminoácidos e a FA, é aumentada
- A deficiência na FAH resulta na acumulação de fenilalanina que é assim transaminada a fenilpiruvato, fenil-lactato e fenilacetato. No entanto, estes metabolitos em pouco contribuem para os danos cerebrais, estando estes relacionados com a influência tóxica da própria FA em si (Knaap e Valk, 2005).
 - A hiperfenilalaninemia inibe a síntese proteica, o que pode estar relacionado com o transporte de a.a. através da barreira hemato-encefálica pelo que a hipomielinização presente na quase maioria dos pacientes deverá estar relacionada com este factor (Knaap e Valk, 2005).
 - Altos níveis de FA têm efeito duplo sobre o metabolismo da tirosina e do triptofano: para além do transporte através da barreira hemato-encefálica inibido, estas altas concentrações também inibem competitivamente a acção das enzimas tirosina e triptofano hidroxilases, enzimas estas de importância extrema, pois estão envolvidas na síntese da dopamina e da epinefrina (obtidas a partir da tirosina) e na síntese de serotonina (obtida a partir do triptofano). Estes neurotransmissores encontram-se portanto diminuídos em doentes com FCU não tratada (Knaap e Valk, 2005).
 - A disfunção neuronal reversível que desaparece com o tratamento, está provavelmente relacionada com a disfunção dos neurotransmissores, ou seja, se não tratada esta disfunção reversível pode tornar-se num dano irreparável, o que se traduz numa redução do número e no crescimento das células neuronais e sinapses (Knaap e Valk, 2005).
 - O atraso na mielinização da substância branca do cérebro leva à ocorrência de lesões na mesma. Este atraso está também relacionado com a toxicidade da FA nas células e com a inibição da síntese proteica (Knaap e Valk, 2005).

3. A enzima FAH

A FAH é uma enzima pertencente à família das hidroxilases dos aminoácidos aromáticos tal como a tirosina e triptofano hidroxilases. É uma enzima homotetramérica, composta por quatro subunidades iguais, sendo regulada pela fosforilação oxidativa destas subunidades. É activada pela FA e inibida pela BH₄ (Vilarinho *et al*, 2006; Li *et al*, 2010).

Esta enzima codifica para o gene *PAH* (do inglês, *phenylalanine hydroxylase*), que está localizado no cromossoma 12q22-q24.2 e contém 13 exões, estando descritas mais de 500 mutações. A mutação mais comum é aquela em que a arginina é substituída pelo triptofano na posição 408 (Arg408Trp) (Williams *et al*, 2008; GHR, 2011).

4. Aspectos clínicos

As crianças que sofrem de FCU são normais no nascimento, mas no curso do primeiro ano de vida o atraso psicomotor associado a outras manifestações clínicas torna-se evidente, quando estas não são atempadamente tratadas (Knaap e Valk, 2005). Situações de cheiro característico intenso (devido à excreção dos ácidos fenilacético e fenilpirúvico), espasmos, alterações no electroencefalograma, microcefalia e eczema são muito comuns nos fenilcetonúricos (Almeida, 2007).

Apesar de não ser regra geral, em muitos casos os pacientes apresentam cabelo loiro, pele clara e olhos azuis. Podem ocorrer convulsões que acabam por tomar a forma tónico-clónica (convulsões que se caracterizam por terem duas fases completamente distintas: a tónica que apresenta movimentos violentos rítmicos e involuntários e a clónica, que apresenta reviramento ocular, perda de consciência, contracção generalizada e simétrica de toda a musculatura) e também pode estar presente um tremor rápido, delicado e irregular nas mãos (Knaap e Valk, 2005). No entanto, estes sintomas estão ausentes em pacientes cujo diagnóstico e tratamento são precoces.

5. Detecção

A FCU é uma desordem incluída nos programas de triagem neonatal da maioria dos países desenvolvidos. É facilmente detectada através do teste do pezinho (teste de Guthrie), um método baseado no crescimento bacteriano diferencial de *Bacillus subtilis* num meio de cultura específico em presença de FA contida em discos de sangue (Cleary, 2010).

Devido ao seu reduzido custo, ainda hoje este teste é utilizado em alguns países, porém, como é um teste semi-quantitativo não pode ser efectuado em recém-nascidos sujeitos a antibioterapia. Em Portugal, foi substituído em meados dos anos 80 por métodos quantitativos como, por exemplo, o método fluorimétrico. Desde 2005 que no nosso país o rastreio desta doença se faz por EM/EM (Vilarinho *et al*, 2006).

Como já foi referido, a EM/EM é um método rápido para alcançar a determinação quantitativa e confiável das concentrações de a.a. em pequenos volumes de sangue ou plasma. É um método que produz menos falsos positivos e que mede os níveis de fenilalanina e tirosina, correlacionando-os. A amostra de sangue para este método deverá ser recolhida entre o segundo e o quinto dia de vida (Blau *et al*, 2011).

O limite máximo estabelecido para a fenilcetonúria é de 3 mg/dL e obriga sempre à repetição do doseamento na mesma amostra. Para valores entre 3 e 6 mg/dL efectua-se controlos periódicos para vigilância. Valores superiores a 6 mg/dL obrigam ao início imediato do tratamento adequado (Vilarinho *et al*, 2006).

Cerca de 2 % de todos os casos em que são detectados níveis elevados de FA, são decorrentes de distúrbios no cofactor BH₄, pelo que um diagnóstico diferencial é, como em todos os EIMs, obrigatório. Para isto, deverá ser efectuada uma análise ao sangue e urina no sentido de medir os níveis das pterinas e ainda uma medição da actividade enzimática da di-hidropterina redutase (Bleu *et al*, 2011).

Bebés prematuros podem apresentar níveis de FA elevados mas nestes casos, também outros a.a. se encontram em concentrações superiores ao habitual, pelo que a hipótese de se estar perante uma situação de FCU é rejeitada; estes bebés devem ser testados ao mesmo tempo que os restantes recém-nascidos (Cleary, 2010).

6. Tratamento

O fundamento no tratamento da FCU é uma dieta pobre em FA, cujo objectivo é a redução ou normalização das concentrações deste a.a. o que impede o desenvolvimento das alterações neurológicas e psicológicas.

Inicialmente, as pequenas quantidades de FA presentes no leite materno e nas fórmulas infantis comerciais são consideradas adequadas para o bebé. Em crianças mais velhas, a ingestão de proteínas é calculada todos os dias consoante as concentrações plasmáticas em FA. Alimentos como ovos, leite, queijo, carne, aves, peixe, feijões e legumes são muito ricos em proteínas e, portanto, excluídos da dieta. No entanto, um regime alimentar cujos alimentos referidos anteriormente estão proibidos não seria suficiente para as normais necessidades de crescimento, pelo que estes pacientes têm de tomar diariamente suplementos de a.a. essenciais disponíveis no mercado.

Os benefícios de uma dieta pobre em proteínas, tal como a monitorização dos níveis de FA são claros, evitando as desordens bioquímicas e conseqüentemente levam a uma melhoria neurológica e psicológica destes pacientes. Porém, o cumprimento rigoroso da dieta, a exigência de apoio social e o potencial desequilíbrio em nutrientes essenciais são riscos com os quais os fenilcetonúricos têm de lidar para toda a vida (Williams *et al*, 2008).

Durante vários anos, era habitual cessar a dieta no final da adolescência ou início da vida adulta, por se pensar que a FA só era prejudicial para um cérebro em desenvolvimento; mais tarde descobriu-se que esta suspensão pode levar a alguma deterioração cognitiva que origina falta de concentração, instabilidade emocional e uma série de outros factores, pelo que, actualmente, as restrições alimentares referidas anteriormente são aconselhadas durante toda a vida (Knaap e Valk, 2005).

Para além da dieta hipoproteica e restrita em fenilalanina existem outros tratamentos em fase de investigação:

- Terapia de reposição enzimática: a enzima fenilalanina amónia liase, não presente em mamíferos, converte a FA numa substância não tóxica denominada ácido *trans*-cinâmico. A estabilidade desta enzima tem vindo a ser alcançada pelo processo de peguilação (no qual se envolve a enzima com polietilenoglicol, um polímero biologicamente inerte) e estudos em ratos mostram que os níveis

de FA na presença desta enzima descem drasticamente. O primeiro ensaio humano está em curso nos Estados Unidos da América (Cleary, 2010).

- Suplementação com a.a. neutros: estes aminoácidos tiveram um papel inicial no tratamento da FCU apenas como combinação com a dieta hipoproteica. No entanto, nem todos os autores os estudam da mesma forma. Há estudos em que a suplementação com a.a. neutros visa a redução da concentração cerebral de fenilalanina, outros, cujo objectivo é a redução destes mesmos níveis mas ao nível plasmático, existindo ainda investigação que tenta relacionar esta suplementação com o aumento dos neurotransmissores cerebrais, e ainda, estudos cujo objectivo é o aumento da própria concentração de a.a. neutros no cérebro. No entanto, todos eles ainda carecem de mais dados para que possam ser viabilizados (Spronsen *et al*, 2010).
- Terapia génica: ao longo das últimas duas décadas tem vindo a ser feito um esforço para tornar a terapia génica num possível tratamento para a FCU. O foco tem sido a substituição do gene mutante *PAH*, por adenovírus ou retrovírus, nas células somáticas do paciente. Esta hipótese tem-se mostrado eficaz em testes feitos em ratos, mas ainda enfrenta barreiras éticas e técnicas no que respeita à sua experimentação em humanos (Sarkissian *et al*, 2009).

IV. DEFICIÊNCIA NA ENZIMA 3-METILCROTONIL-CoA CARBOXILASE

A deficiência na enzima 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (DMCC) é uma doença autossômica recessiva do catabolismo da leucina, sendo uma das doenças mais frequentes relacionadas com as desordens dos ácidos orgânicos (Darin *et al*, 2007; Arnold *et al*, 2008). Em Portugal, é a doença mais comum dos ácidos orgânicos tendo uma incidência de 1 caso em cada 45.178 nascimentos (Vilarinho *et al*, 2010).

Tradicionalmente, esta doença é diagnosticada nos primeiros dias de vida apresentando sintomas característicos. No entanto, a DMCC também tem sido relatada em indivíduos assintomáticos que apresentam evolução neurológica normal (Arnold *et al*, 2008).

A enzima 3-MCC é uma das quatro enzimas carboxilases mitocondriais biotina-dependentes presentes no homem, sendo as outras três a propionil-CoA carboxilase, a piruvato carboxilase e a acetil-CoA carboxilase (Nguyen *et al*, 2011).

1. Via metabólica envolvida

A leucina, juntamente com a valina e a isoleucina, é um dos três aminoácidos de cadeia ramificada. A metabolização destes aminoácidos envolve um processo pouco comum que é iniciado no músculo, sendo por este motivo uma excelente fonte de energia, uma vez que durante a sua degradação são formados NADH e FADH₂. Apesar destes aminoácidos originarem produtos finais diferentes, as primeiras etapas no seu metabolismo são idênticas (Devlin, 2006).

A primeira reacção da degradação comum para estes três a.a. é efectuada pelas transaminases dos aminoácidos de cadeia ramificada, originando um α -cetoácido. A segunda reacção deste processo catabólico é catalisada por uma α -cetoácido desidrogenase que provoca uma descarboxilação oxidativa no α -cetoácido que é transformado em acil-CoA. Este é posteriormente oxidado por uma acil-CoA desidrogenase e é neste ponto que o processo de degradação comum se separa, dando esta reacção origem, no caso da leucina, à 3-metilcrotonil-CoA, com libertação de FADH₂ (Horton *et al*, 2006).

Como se pode confirmar na Figura 5, é no passo subsequente que ocorre a desordem: a deficiência na enzima seguinte, a 3-MCC, não permite a formação de 3-metilglutaconil-CoA, que posteriormente seria transformado em HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-

CoA), que por acção de uma liase formaria o produto final: acetil-CoA e acetoacetato, sendo este último também convertido em acetil-CoA (Devlin, 2006).

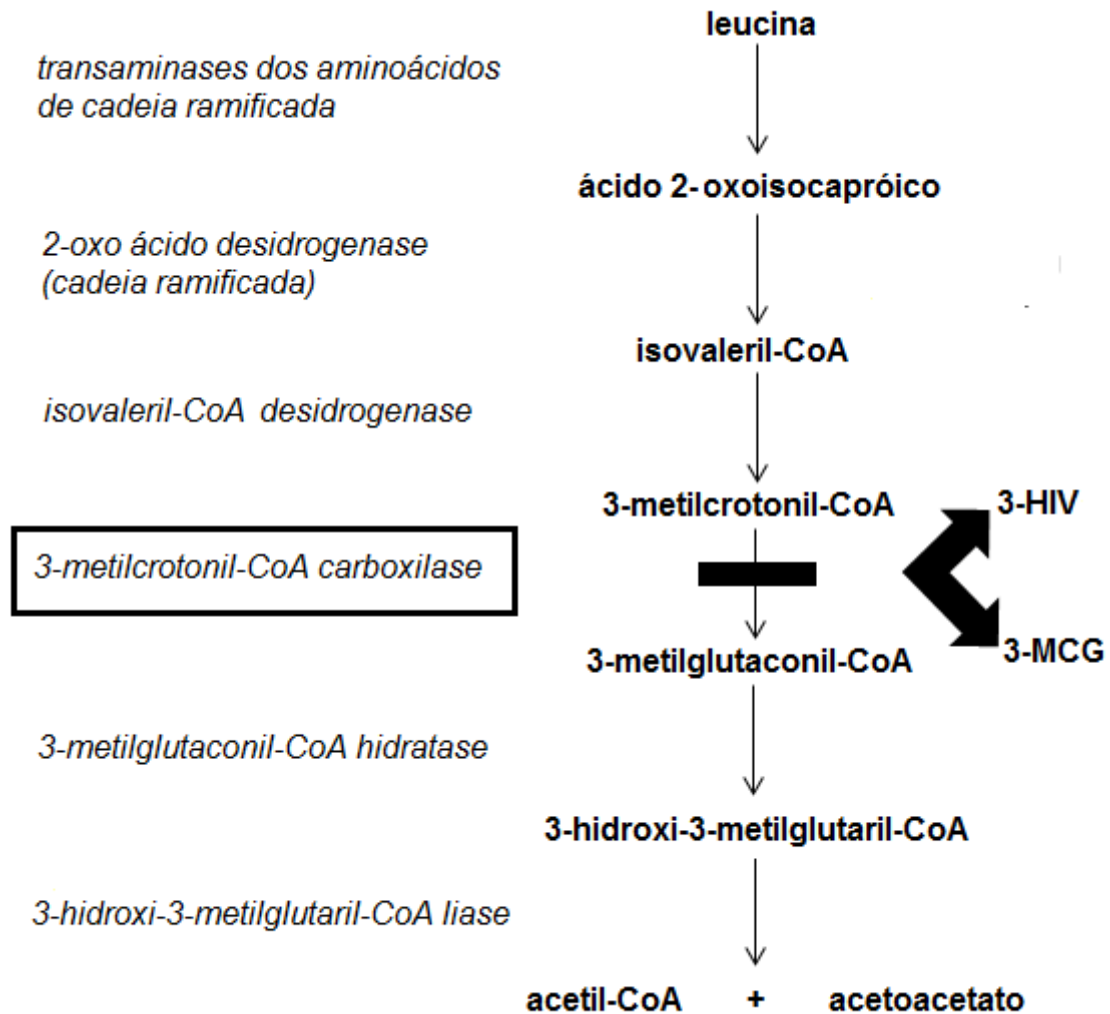


Figura 5 - Processo de degradação da leucina, evidenciando a deficiência na 3-MCC (adaptado de Stadler *et al*, 2006).

2. Fisiopatologia e aspectos clínicos

A deficiência na 3-metilcrotonil-CoA carboxilase tem uma apresentação clínica extremamente variável, que pode ir desde graves distúrbios neurológicos e morte a pacientes assintomáticos. O mecanismo responsável por este facto não é ainda muito claro, o que leva a crer que não exista nenhuma correlação genótipo-fenótipo nestes indivíduos. No entanto, pacientes com DMCC partilham uma característica comum:

apresentam uma elevada excreção urinária de ácido 3-hidroxi-isovalérico (3-HIV) e 3-metilcrotonilglicina (3-MCG), geralmente em combinação com uma deficiência secundária em carnitina (Baykal *et al*, 2005; Darin *et al*, 2007).

A DMCC é um distúrbio fenotipicamente heterogéneo cujos principais sintomas clínicos são deficiência no crescimento, atraso psicomotor, hipotonia ou hipertonia e ainda cardiomiopatia. Uma grave descompensação metabólica após *stress* agudo (geralmente causado por infecções ou excesso de proteína na dieta) acompanhada por acidemia e convulsões, leva a danos neurológicos permanentes: imagens do cérebro normalmente revelam edema cerebral, leucodistrofia e atrofia cerebral principalmente na área subcortical dos lobos frontal, temporal e parietal. Embora estas sejam características predominantes da DMCC a patogénese relativa a todo o dano cerebral não é ainda totalmente conhecida (Moura *et al*, 2011).

Nos casos em que existem graves danos no Sistema Nervoso Central, os pacientes apresentam níveis normais de glicose no sangue e os agravamentos dos sinais neurológicos não costumam ser relacionados com episódios de hipoglicemia, o que sugere que os metabolitos que se acumulam sejam potencialmente neurotóxicos e contributivos para a patogénese da doença. Por este motivo, recentemente um grupo de investigadores decidiu avaliar *in vitro* os efeitos da 3-MCG sob importantes parâmetros bioquímicos. Centraram-se apenas neste metabolito, uma vez que estudos anteriores já tinham provado que o ácido 3-HIV não comprometia a função cerebral em roedores, o que reforçou a necessidade de estudar os efeitos da 3-MCG (Moura *et al*, 2011).

Os autores concluíram então que *in vitro* a 3-MCG inibe fortemente (até 45 %) a acção da enzima Na^+K^+ -ATPase presente na membrana plasmática sináptica e cuja acção é muito importante para a excitabilidade neuronal e para o controlo do volume celular (Moura *et al*, 2011).

Esta enzima, normalmente, encontra-se presente no cérebro em altas concentrações, consumindo cerca de 40 a 50 % do ATP produzido no tecido cerebral. Este grupo de investigadores presumiu assim que, pelo menos *in vitro*, a interrupção da produção de energia e neurotransmissão contribuem sinergicamente com outros factores para explicar os danos neurológicos encontrados nos pacientes com DMCC (Moura *et al*, 2011).

3. A enzima 3-MCC

A enzima 3-MCC é composta por duas subunidades, MCC α e MCC β , que codificam para os genes *MCCA* (do inglês, *methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1 alpha*) e *MCCB* (do inglês, *methylcrotonoyl-CoA carboxylase 2 beta*) respectivamente. A subunidade α promove a ligação covalente ao grupo prostético da biotina e contém locais para ligação de bicarbonato e de ATP, enquanto a subunidade β possui o local de ligação ao substrato metilcrotonil-CoA (Dantas *et al*, 2005).

O gene *MCCA* encontra-se localizado no cromossoma 3q26-q28 e consiste em 19 exões, ao passo que o gene *MCCB* se encontra no cromossoma 5q12-q13 e consiste em 17 exões. As mutações nestes genes são a origem da deficiência nesta enzima e, até à data, foram descritas na literatura 28 mutações referentes a alelos do gene *MCCA* e 41 relativas a alelos do gene *MCCB* (Nguyen *et al*, 2011).

Nas tabelas seguintes, podem-se conhecer algumas destas mutações:

Tabela 1 - Algumas mutações referentes ao gene *MCCA* e suas consequências
(adaptado de Dantas *et al*, 2005).

Nº alelos detectados	Mudança ao nível dos nucleótidos de cDNA	Exão/ Intrão	Troca de aminoácido (ao nível do RNA)	Consequência (ao nível do RNA)
1	c.400G>A	exão 5	p.E134K	<i>Missense</i>
1	c.559T>C	exão 6	p.S187P	<i>Missense</i>
1	c.694C>T	exão 7	p.R232W	<i>Missense</i>
1	c.872C>T	exão 8	p.A291V	<i>Missense</i>
4	c.1155A>C	exão 11	p.R385S	<i>Missense</i>
1	c.1527C>A	exão 13	p.C509X	<i>Nonsense</i>
1	c.1930G>T	exão 17	p.E644X	<i>Nonsense</i>
1	c.640_641delGG	exão 7	p.G214IfsX5	<i>Frameshift</i>
1	c.1263dupG	exão 11	p.Q421AfsX10	<i>Frameshift</i>
1	c.1526_1527delG	exão 13	p.C509SfsX38	<i>Frameshift</i>
1	c.2088dupA	exão 19	p.V697SfsX19	<i>Frameshift</i>
1	c.1682-3A>G	intrão 14	p.N561KfsX10	<i>Splice</i>

Tabela 2 - Algumas mutações relativas ao gene *MCCB* e suas consequências (adaptado de Dantas *et al*, 2005).

Nº alelos detectados	Mudança ao nível dos nucleótidos de cDNA	Exão/Intrão	Troca de aminoácido (ao nível do RNA)	Consequência (ao nível do RNA)
3	c.295G>A	exão 4	p.E99Q	<i>missense</i>
2	c.463C>T	exão 5	p.R155W	<i>missense</i>
2	c.464G>A	exão 5	p.R155Q	<i>missense</i>
2	c.568C>T	exão 6	p.H190Y	<i>missense</i>
2	c.845A>G	exão 9	p.H282R	<i>missense</i>
2	c.929C>G	exão 10	p.P310R	<i>missense</i>
1	c.1123G>T	exão 12	p.V375F	<i>missense</i>
2	c.1367C>T	exão 14	p.A456V	<i>missense</i>
2	c.127C>T	exão 1	p.Q43X	<i>nonsense</i>
1	c.214C>T	exão 3	p.R72X	<i>nonsense</i>
2	c.469C>T	exão 5	p.Q157X	<i>nonsense</i>
1	c.994C>T	exão 10	p.R332X	<i>nonsense</i>
1	c.416_427del12ins16	exão 5	p.T139_6143RWVPGEfSx35	<i>frameshift</i>
2	c.517dupT	exão 6	p.S173FfsX25	<i>frameshift</i>
2	c.282-1G>C	intrão 3	p.694_S127del	<i>splice</i>
2	c.803G>C	exão 8	p.R268T	<i>splice</i>
2	c.1054G>A	exão 11	p.6352R+p.V334_6358delins	<i>splice/missense</i>
3	c.1574+1G>A	intrão 16	p.F497_V526>GfsX4	<i>splice</i>
1	C.1690T>C	exão 17	p.X564QLE	Adicionados 3 a.a. ao C-terminal

4. Detecção

Pacientes com DMCC são, actualmente em Portugal, identificados através de triagem neonatal por EM/EM.

O teste mais utilizado, e mais informativo, é uma análise aos ácidos orgânicos presentes na urina, uma vez que os pacientes com esta deficiência apresentam uma excreção aumentada de ácido 3-hidroxi-isovalérico e de 3-metilcrotonilglicina, encontrando-se este último composto aumentado em episódios de *stress* metabólico agudo (Pasquali *et al*, 2006).

Outro processo utilizado no diagnóstico desta doença centra-se na detecção de um aumento da concentração plasmática de espécies com cinco carbonos hidroxiladas (C5-OH) correspondentes a 3-hidroxi-isovaleril-carnitina, pois os derivados de acil-CoA que se acumulam são *trans*-esterificados para ésteres de acil-carnitina (Dantas *et al*, 2005; Pasquali *et al*, 2006). De notar que um aumento isolado desta acilcarnitina, pode ser

interpretado apenas como uma deficiência em biotinidase, diagnóstico este facilmente excluído através de uma medição da actividade enzimática da 3-MCC no soro (Pasquali *et al*, 2006).

Os testes confirmatórios destes processos de diagnóstico são normalmente obtidos através da demonstração da deficiente actividade da 3-MCC, em comparação com a normal actividade de outra carboxilase biotina-dependente, em fibroblastos cultivados da pele ou em linfócitos isolados. Regra geral, a actividade da 3-MCC avaliada em fibroblastos cultivados de pacientes com a deficiência, é inferior a 2 % da média do valor de controlo (Baumgartner, 2005).

5. Tratamento

O tratamento da DMCC actualmente assenta em duas áreas principais. A primeira, e como seria de esperar, relaciona-se com uma dieta pobre em proteínas que deverá ser adequadamente implementada a estes pacientes, uma vez que estes ficam sujeitos a episódios de *stress* agudo não desejáveis quando a alimentação não é a recomendável.

A segunda relaciona-se com a deficiência em carnitina, que tem vindo a ser relacionada com as situações de cardiomiopatia e morte e também necessita de tratamento. Os níveis deste aminoácido caem frequentemente durante episódios intercorrentes, principalmente quando esta é mais necessária, ou seja, em situações cuja necessidade de energia esteja dependente da oxidação de gorduras. Uma vez que indivíduos sintomáticos demonstram sensibilidade ao jejum, é recomendado que recebam suplementação de carnitina para manterem as suas reservas repletas (Arnold *et al*, 2008).

Estas duas opções de tratamento normalmente usadas em conjunto são, como já foi referido, as mais utilizadas para fazer frente a esta deficiência. No entanto, os seus benefícios dependem de caso para caso, como se pode perceber com os dois exemplos apresentados a seguir:

- Em 2006, Pinto e seus colegas, diagnosticaram DMCC numa criança de 3 anos. O tratamento a que foi sujeito incluía uma dieta pobre em proteínas (1 g/kg/dia) e suplementação com L-carnitina (100 mg/kg/dia). Ao fim de dois anos, as melhoras motoras e psicomotoras eram notáveis, sendo que com dois anos e dez meses a criança estava a começar a andar e a falar. O tratamento manteve-se nos anos subsequentes (Pinto *et al*, 2006).

- Em 2005, Baykal e seus colegas, acompanharam uma criança cuja DMCC foi diagnosticada logo à nascença e cujo tratamento foi semelhante: dieta com restrição de proteínas (1 g/kg/dia), suplementação com L-carnitina (100 mg/kg/dia), e também eram administradas altas doses de biotina (3 a 60 mg/dia). Em nenhum momento o recém-nascido apresentou melhoria clínica ou bioquímica, não conseguindo sobreviver ao fim de 33 dias (Baykal *et al*, 2005).

V. CONCLUSÃO

Mais de 100 anos passaram desde que Archibald Garrod caracterizou a alcaptonúria como o primeiro erro inato do metabolismo. Foi o início de um grande e contínuo processo de investigação, não só na tentativa de perceber o porquê da ocorrência destas desordens metabólicas, mas também no que diz respeito à sua detecção, ao seu tratamento, ao conhecimento necessário a um profissional de saúde que lide de perto com estas situações e ao apoio que será necessário dar à família do paciente, e ao próprio, por todas as mudanças que um EIM poderá provocar nas suas vidas.

O campo dos EIMs passou ao longo destes anos por uma série de fases, cada uma das quais diferente nas características e nas abordagens intelectuais, mas todas contribuindo para aquilo que hoje se sabe relativamente a este tema. Apesar da constatação de que existem ainda muitas limitações e barreiras para conquistar, não deve ser perdido de vista o enorme progresso que já foi feito.

Também em Portugal o esforço para perceber e controlar estas desordens tem sido notável e, actualmente, é feita uma triagem neonatal de cerca de 25 EIMs relacionados com os aminoácidos, o ciclo da ureia, os ácidos orgânicos e com a β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos. Na impossibilidade de deter a sua ocorrência, o objectivo principal passará pela minimização dos danos que estas patologias causam na saúde dos pacientes por elas afectados.

Este trabalho permitiu a caracterização geral das três desordens cuja prevalência é maior dentro do nosso território. Foram explicadas as vias metabólicas onde ocorrem as três desordens e o erro daí resultante, facto este, responsável pela ocorrência destes distúrbios.

No nosso país, a desordem mais frequente é a DADCM (1:9036 nascimentos), seguida da FCU (1:12163 nascimentos) e da DMCC (1:45178 nascimentos). A primeira, relacionada com o metabolismo dos lípidos, ocorre por deficiência na enzima acil-CoA desidrogenase não permitindo a transformação de acil-CoA em trans- Δ^2 -enoil-CoA, o que compromete todo o processo seguinte referente à β -oxidação.

A deficiência na fenilalanina hidroxilase provoca a FCU, a segunda desordem mais frequente. Esta desordem impede a normal via de metabolização da fenilalanina, não permitindo a transformação desta em tirosina, facto este que bloqueia as restantes etapas reaccionais.

Por fim, a DMCC, a terceira mais frequente, afecta o metabolismo da leucina e a deficiência da 3-metilcrotonil-CoA carboxilase não permite a transformação de 3-metilcrotonil-CoA em 3-metilglutaconil-CoA, originando metabolitos diferentes dos esperados, os quais são responsáveis por este EIM.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M. (2007). Consenso para o tratamento nutricional da fenilcetonúria. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 38 (1), pp. 44-54.

Amâncio, F.A.M., Scalco, F.B., Coelho, C.A.R. (2007). Investigação diagnóstica de erros inatos do metabolismo em um hospital universitário. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica*, 43(3), pp. 169-174.

Arnold, G.L., Koeberl, D.D., Natern, D., Barshop, B., Braverman, N., Burton, B., Cederbaum, S., Fiegenbaum, A., Garganta, C., Gibson, J., Goodman, S.I., Harding, C., Kahler, S., Kronn, D., Longo, N. (2008). A Delphi-based consensus clinical practice protocol for the diagnosis and management of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 93, pp. 363-370.

Andresen, B.S., Bross, P., Udvari, S., Kirk, J., Gray, G., Kmoch, S., Chamoles, N., Knudsen, I., Winter, V., Wilcken, B., Yokota, I., Hart, K., Packman, S., Harpey, J.P., Saudubray, J.M., Hale, D.E., Bolund, L., Kølvråa, S., Gregerson, N. (1997). The molecular basis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in compound heterozygous patients: is there correlation between genotype and phenotype? *Human Molecular Genetics*, 6(5), pp. 695-707.

Banta-Wright, A.S., Steiner, R.D. (2003). Not so rare: errors of metabolism during the neonatal period. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 3(4), pp. 143-155.

Baumgartner, M.R. (2005). Molecular mechanism of dominant expression in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 8, pp. 301-309.

Baykal, T., Gokcay, G.H., Ince, Z., Dantas, M.F., Fowler, B., Baumgartner, M.R., Demir, F., Can, G., Demirkol, M. (2005). Consanguineous 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: early on-set necrotizing encephalopathy with letal outcome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28, pp. 229-233.

Blau, N., Hennermann, J.B., Langenbeck, U., Lichter-Konecki, U. (2011). Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH₄) deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*. [Artigo em impressão].

Blau, N., Spronsen, F.J., Levy, H.L. (2010). Phenylketonuria. *The Lancet*, 376, pp. 1417-1424.

Chace, H., Hillman, S., Van-Hove, K., Naylor, E. (1997). Rapid diagnosis of MCAD deficiency: quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 43(11), pp. 2106-2113.

Cleary, M.A. (2010). Phenylketonuria. *Paediatrics and Child Health*, 21(2), pp. 61-64.

Dantas, M.F., Suormala, T., Randolph A., Coelho, D., Fowler, B., Valle, D., Baumgartner, M.R. (2005). 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: mutation analysis in 28 probands, 9 symptomatic and 19 detected by newborn screening. *Human Mutation*, 26(2), pp. 164-175.

Darin, N., Anderson, O., Wiklund, L.M., Holmegren, D., Holme, E. (2007). 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency and severe multiple sclerosis. *Pediatric Neurology*, 36, pp. 132-134.

Devlin, T.M. (2006). *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. 6ª Edição, New Jersey, Wiley-Liss, pp. 680-684, 760-764, 776-778.

Dronamraju, K. (1992). Profile in Genetics: Archibald E. Garrod. *American Journal of Human Genetics*, 51, pp. 216-219.

Galjaard, H. (1987). Fetal Diagnosis of Genetic Defects. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 1, pp. 547-567.

GHR - *Genetics Home Reference*. [Em linha]. Disponível em <<http://ghr.nlm.nih.gov>>. [Consultado em 13/11/2011].

Hale, D.E., Stanley, C.A., Coates, P.M. (1990). Genetic defects of acyl-CoA dehydrogenases: studies using an electron transfer flavoprotein reduction assay. *Progress in Clinical Biological Research*, 321, pp. 333-348.

Groot, M.J., Hoeksma, M., Blau, N., Reijngoud, D.J., Spronsen, F.J. (2010). Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of the hypotheses. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99, pp. S86-S89.

Horton, H., Moran, L., Scrimgeour, K., Perry, M., Rawn, J. (2006). *Principles of Biochemistry*. 4ª Edição, New Jersey, Pearson Prentice Hall.

Jameson, E., Walter, J. H. (2010). Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency – a review. *Paediatrics and Child Health*, 21(2), pp. 90-93.

Jones, P., Bennett, M. (2002). The changing face of newborn screening: diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 324, pp. 121–128.

Knaap, M.S., Valk, J. (2005). *Magnetic Resonance of Myelination and Myelin Disorders*. 3ª Edição, Nova Iorque, Springer, pp. 284-293.

Laforêt, P., Saban, C.V. (2010) Disorders of muscle lipid metabolism: diagnostic and therapeutic challenges. *Neuromuscular Disorders*, 20, pp. 693-700.

Leonard, J.V., Morris, A.A.M. (2000). Inborn errors of metabolism around time of birth. *The Lancet*, 356, pp 583-587.

Li, J., Ilangoan, U., Daubner, S.C., Hinck, A.P., Fitzpatrick, P.F. (2010). Direct evidence for a phenylalanine site in regulatory domain of phenylalanine hydroxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505, pp. 250-255.

Limketkai, B.N., Zucker, S.D. (2007). Hyperammonemia encephalopathy caused by carnitine deficiency. *Journal of General Internal Medicine*, 23(2), pp. 210-213.

Matern, D., Rinaldo, P. (2005). Medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Gene Reviews* [Em linha]. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1424/>> [Consultado em 19/10/2011].

Moura, A.P., Ribeiro, C.A.J., Zanatta, A., Busanello, E.N.B., Tonin, A.M., Wajner, M. (2011). 3-methylcrotonylglycine disrupts mitochondrial energy homeostasis and inhibits synaptic Na⁺,K⁺ - ATPase activity in brain of young rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, [Artigo em impressão].

Nguyen, K.V., Naviaux, R.K., Patra, S., Barshop, B.A., Nyhan, W.L. (2011). Novel mutation in the human MCCA and MCCB gene causing methylcrotonylglycinuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 102, pp. 218-221.

Padilla, C.D., Krotoski, D., Therrell Jr, B.L. (2010). Newborn screening progress in developing countries – overcoming internal carriers. *Seminars in Perinatology*, 34, pp. 145-155.

Pasquali, M., Monsen, G., Richardson, L., Alston, M., Longo, N. (2006). Biochemical findings in common inborn errors of metabolism. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 142C, pp. 64-76.

Pinto, L., Zen, P., Rosa, R., Paskelin, G., Perla, A., Barea, L., Baumgartner, M.R., Dantas, M.F., Fowler, B., Giugliani, R., Vargas, C., Wajner, M., Graziadio, C. (2006). Isolated 3-methylcrotonyl Coenzyme A carboxylase deficiency in a child with metabolic stroke. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29, pp. 205-206.

Rhead, W.J. (2005). Newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency – a global perspective. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29, pp. 370-377.

Sarkissian, C.N., Gámez, A., Scriver, C.R. (2009). What we know that could influence future treatment of phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32, pp. 3-9.

Saudubray, J.-M., Sedel, F., Walter, J.H. (2006). Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29, pp. 261-274.

Schatz, U.A., Ensenauer, R. (2010). The clinical manifestation of MCAD deficiency: challenges towards adulthood in the screened population. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33, pp. 513-520.

Seymour, C.A., Cockburn, F., Thomason, M.J., Littlejohns, P., Chalmers, R.A., Lord, J., Addison, G.M., Wilcox, A.H., Bain, M.D. (1997). Newborn screening for inborn errors of metabolism: a systematic review. *Health Technology Assessment*. 1(11), pp. 1-112.

Sharrard, M., Pollitt, R. (2007). Metabolic screening in children: newborn screening for metabolic diseases past, present and future. *Paediatrics and Child Health*, 17(7), pp. 273-277.

Smith, L., Harding, C. (2006). Inborn errors of metabolism. In: *Pediatric Clinical Care*, 3ª Edição. pp. 1085-1104.

Spiekerkoetter, U., Bastin, J., Gillingham, M., Morris, A., Wijburg, F., Wilcken, B. (2010). Current issues regarding treatment of mitochondrial fatty acid oxidation disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33, pp. 555-561.

Spronsen, F.J., Groot, M.J., Hoeksma, M., Reijngoud, D.-J., Rijn, M. (2010). Large neutral aminoacids in the treatment of PKU: from theory to practice. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33, pp. 671-676.

Stadler, S.C., Polametz, R., Maier, E.M., Heidenreich, S.C., Niederer, B., Mayerhofer, P.U., Lagler, F., Koch, H.-G., Santer, R., Fletcher, J.M., Ramieri, E., Das, A.M., Spierkotter, U., Schwab, K.O., Potzsch, S., Marquardt, I., Hennermann, J.B., Knerr, I., Mahmutoglu, S., Kohlschmidt, N., Liebl, B., Fingerhut, R., Olgemoller, B., Muntau, A.C., Adelbert, R.A., Roschinger, W. (2006). Newborn screening for 3-methylcrotonyl-

CoA carboxylase deficiency: population heterogeneity of MCCA and MCCB mutations and impact on risk assessment. *Human Mutation*, 27(8), pp. 748-759.

Tran, K., Banerjee, S., Li, H., Noorani, H.Z., Mensikai, S., Dooley, K. (2007). Clinical efficacy and cost effectiveness of newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency using tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 40, pp. 235-241.

Vilarinho, L., Rocha, H., Sousa, C., Marcão, A., Fonseca, H., Bagas, M., Osório, R.V. (2010). Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *Journal of Metabolic Disease*, [Artigo em impressão].

Vilarinho, L., Queirós, A., Leandro, P., Almeida, I., Rivera, I. (2006). Fenilcetonúria Revisitada. *Arquivos de Medicina*, 20 (5-6), pp. 161-172.

Visão Bioquímica. [Em linha]. Disponível em <http://www.bioq.unb.br/index_br.php>. [Consultado em 11/11/2011].

Wanders, R., Vreken, P., Den-Boer, M., Wijburg, F., Gennip, A. (1999). Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA β -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 22, pp. 442-487.

Wilhelm, G.W. (2006). Sudden death in a young woman from medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *The Journal of Emergency Medicine*, 30(3), pp. 291-294.

Williams, R.A., Mamotte, C.D.S., Burnett, J.R. (2008) Phenylketonuria: An inborn error of phenylalanine metabolism. *Clinical Biochemical Reviews*, 29, pp. 31-38.

Woo, H.I., H., Park, H.-D., Lee, Y.-W., Lee, D.H., Ki, C.-S., Lee, S.-Y., Kim, J.-W. (2011). Clinical, biochemical and genetic analyses in two Korean patients with medium chain acyl-coA dehydrogenase deficiency. *The Korean Journal of Laboratorial Medicine*, 31, pp. 54-60.

Xu, K., Wang, L., Cai, H., Zhang, T., Zhang, C., Matsumoto, I. (2001). Screening for inborn errors of metabolism using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 758, pp. 75–80.