

Sofia Ferreira da Costa

**Desordens no metabolismo dos aminoácidos**

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Porto, 2013





Sofia Ferreira da Costa

**Desordens no metabolismo dos aminoácidos**

Orientadora: Professora Doutora Carla Sousa e Silva

Coorientadora: Professora Doutora Carla Moutinho

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2013

Sofia Ferreira da Costa

## **Desordens no metabolismo dos aminoácidos**

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

---

(Sofia Ferreira da Costa)

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 consistem numa condição genética em que ocorre uma mutação ao nível dos genes que codificam enzimas envolvidas num determinado processo metabólico; tal mutação origina a deficiência de uma enzima, o que faz com que o processo metabólico não ocorra. A consequência pode passar pela acumulação do substrato duma reação no organismo, pela deficiência de produto dessa mesma reação, pela acumulação de metabolitos intermediários da reação, pela falta de *feedback* negativo e ainda pela falha nos mecanismos de transporte. Os erros inatos do metabolismo podem ocorrer na via dos hidratos de carbono, dos aminoácidos, dos ácidos orgânicos, das purinas e pirimidinas, dos lípidos e ácidos biliares. Neste momento em Portugal, a deteção de alguns erros inatos de metabolismo está inserida num programa de triagem neonatal, programa este que se baseia no diagnóstico de 25 doenças utilizando amostras de sangue.

Neste trabalho serão abordados os erros inatos do metabolismo associados aos aminoácidos, nomeadamente, os mais frequentes em Portugal: fenilcetonúria, hiperfenilalaninemia, tirosinemia tipo I, tirosinemia tipo II, homocistinúria, deficiência na metionina adenosiltransferase e doença da urina de xarope de bordo.

Para além de se caracterizar cada uma destas desordens, faz-se uma referência à via metabólica envolvida, assim como ao diagnóstico e tratamento de cada uma delas.

## **ABSTRACT**

Inborn errors of metabolism consist of a genetic condition which a mutation occurs at the level of genes encoding enzymes involved in a specific metabolic process; the mutation causes a deficiency in an enzyme, which does not enable the metabolic process occur. The consequence can pass by the accumulation of the substrate or by the product deficiency of a certain reaction, by the accumulation of intermediate metabolites of the reaction, by the lack of negative feedback and even failure in the transport mechanisms.

Inborn errors of metabolism may occur in the path of carbohydrates, amino acids, organic acids, purines and pyrimidines, lipids and bile acids. At this point in Portugal the detection of some inborn errors of metabolism is inserted in a neonatal screening program, which is based on the diagnosis of 25 diseases using blood samples.

In this work the inborn errors of metabolism associated with amino acids are discussed, including the most frequently in Portugal: phenylketonuria, hyperphenylalaninemia, tyrosinemia type I, tyrosinemia type II, homocystinuria, methionine adenosyl transferase deficiency and maple syrup urine disease.

Each of these disorders are characterized and the metabolic pathway involved, as well as the diagnosis and treatment are referred.

## **Agradecimentos**

Ao longo da elaboração desta monografia tive imenso apoio por parte daqueles que me rodeiam. Um agradecimento especial aos meus pais e à minha irmã por todo o apoio, paciência e incentivo demonstrados ao longo deste período.

Quero agradecer à Professora Doutora Carla Sousa e Silva e à Professora Doutora Carla Moutinho por todo o profissionalismo e dedicação demonstrados na orientação da elaboração deste trabalho.

Gostaria apenas de demonstrar o meu apreço aos meus amigos por todo o apoio e toda a motivação manifestados.

## ÍNDICE GERAL

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.Estrutura geral de um aminoácido e suas características.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Metabolismo dos aminoácidos .....</b>	<b>2</b>
2.1 Síntese da ureia.....	5
<b>3. Erros inatos do metabolismo .....</b>	<b>6</b>
3.1 Classificação dos erros inatos do metabolismo.....	8
3.2 Diagnóstico.....	9
3.2.1 Programa de triagem neonatal .....	11
3.2.2 Testes de confirmação .....	12
3.3 Perspetiva histórica .....	13
3.4 Tratamento .....	13
<b>II. DISTÚRBIOS NO METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS .....</b>	<b>14</b>
<b>4. Os distúrbios no metabolismo dos aminoácidos em Portugal.....</b>	<b>15</b>
4.1. Hiperfenilalaninemia.....	15
4.1.1 Fenilalanina .....	16
4.1.2. Tetra – hidrobiopetrina (BH4).....	16
4.1.3 Via metabólica da fenilalanina .....	17
4.1.4 Fenilcetonúria e HPA .....	18
4.1.5 Aspetos clínicos.....	19
4.1.6 Diagnóstico.....	19
4.1.7 Tratamento .....	21
4.2 Tirosinemia tipo I.....	22
4.2.1 Aspetos clínicos.....	23

4.2.2	Tirosina.....	23
4.2.3	Via metabólica envolvida.....	24
4.2.4	Diagnóstico.....	25
4.2.5	Tratamento .....	27
4.2.5.1	2-(2-nitro-4-trifluormetilbenzoil-1,3-ciclo-hexanadiona (NTBC)).....	27
4.3	Tirosinemia tipo II.....	28
4.3.1	Tirosina aminotransferase (TAT) .....	29
4.3.2	Aspetos clínicos.....	30
4.3.3	Diagnóstico.....	31
4.3.4	Tratamento .....	32
4.4.	Deficiência na metionina adenosiltransferase .....	32
4.4.1	Via metabólica envolvida.....	33
4.4.2	Metionina adenosiltransferase .....	34
4.4.3	S-adenosilmetionina .....	34
4.4.4	Aspetos clínicos.....	35
4.4.5	Diagnóstico.....	35
4.4.6	Tratamento .....	36
4.5	Homocistinúria .....	37
4.5.1	Homocisteína (Hcy) .....	38
4.5.2	Cistationina $\beta$ -sintase .....	39
4.5.3	Aspetos clínicos.....	39
4.5.4	Diagnóstico.....	40
4.5.5	Tratamento .....	41
4.6	Doença da urina de xarope de bordo.....	41
4.6.1	Aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) - leucina, isoleucina e valina.....	42
4.6.2	Complexo enzimático $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (BCKD) .....	43

4.6.3 Via metabólica relativo ao distúrbio.....	44
4.6.4 Aspectos clínicos.....	44
4.6.5 Diagnóstico.....	45
4.6.6 Tratamento .....	45
<b>III. CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral de um aminoácido. ....	1
Figura 2. Reação de transaminação. ....	4
Figura 3. Desaminação oxidativa .....	4
Figura 4. Ciclo da ureia. ....	5
Figura 5. Diagrama representativo das causas e consequências das desordens metabólicas. ....	7
Figura 6. Via principal do metabolismo da fenilalanina .....	18
Figura 7. Via metabólica da tirosina, evidenciando o defeito que ocorre na tirosinemia tipo I.....	25
Figura 8. Interrupção da via metabólica da tirosina associada à desordem tipo II.....	29
Figura 9. Metabolismo da metionina, S-adenosilmetionina, homocisteína, cistationina e compostos relacionados.....	34
Figura 10. Via metabólica da homocisteína .....	39

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Aminoácidos essenciais e não essenciais.....	2
<b>Tabela 2-</b> Sintomatologia indicativa de EIM.....	9
<b>Tabela 3-</b> Tipos de HPA e concentrações correspondentes.....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS

BH4- tetra-hidrobiopterina

BCAA- aminoácidos de cadeia ramificada (do inglês *branched-chain amino acids*)

BCKD-complexo enzimático  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (do inglês do inglês  *$\alpha$ - keto acid dehydrogenase branched chain*)

CBS- cistationina  $\beta$ -sintase

DHPR- di-hidropterina redutase

DNA- ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

EIM- erros inatos do metabolismo

E1-  $\alpha$ -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada (do inglês *branched-chain  $\alpha$ -keto acid descarboxylase*)

E2- di-hidrolipoil transacilase (do inglês *dihydropoyl transacylase*)

E3- di-hidroxilipoamida desidrogenase (do inglês *dihydrolipoamide dehydrogenase*)

FAH- fumarilacetoacetase (do inglês *fumarylacetoacetate hydrolase*)

HCU- homocistinúria (do inglês *homocystinuria*)

Hcy- homocisteína (do inglês *homocysteine*)

HIC- ácido  $\alpha$ -hidroxisocapróico (do inglês *acid  $\alpha$ -hydroxide caproic*)

HIV- ácido  $\alpha$ -hidroxisovalérico (do inglês *acid  $\alpha$ -hydroxy valeric*)

HMV- **ácido**  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -metil-n-valérico (do inglês *acid  $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -methyl-n-valeric*)

HPA- hiperfenilalamina ( do inglês *hyperphenylalaninaemia*)

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

HT1- tirosinemia tipo I

5-HTP- 5-hidroxitriptofano (do inglês *5-hydroxyltryptophan*)

Ile- isoleucina

LC-MS/MS-cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa *tandem* (do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry*)

Leu- leucina (do inglês *leucine*)

L-Met- metionina

MAT-metionina adenosiltransferase

MSUD- doença da urina de xarope de bordo (do inglês *maple sryup disease*)

NTBC- 2- (2-nitro-4-trifluormetilbenzoi) -1,3-ciclo-hexanodiona)

PAH- fenilalanina hidroxidase (do inglês *phenylalanine hydroxilase*)

PCR- reação em cadeia polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

Phe- fenilalanina (do inglês *phenylalanine*)

PKU- fenilcetonúria (do inglês *phenylketonuria*)

SA- succinuilacetona

SAA- succinilaceteoacetato

SAH- S-adenosil-homocisteína

SAM- S-adenosilmetionina

STD- S-adenosilmetionina dissulfato

TAT- tirosina aminotransferase

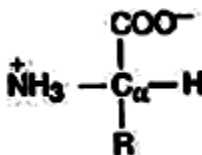
Tyr- tirosina (do inglês *tyrosine*)

Val- valina

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Estrutura geral de um aminoácido e suas características

Os aminoácidos são biomoléculas fundamentais por serem precursores de proteínas e por, devido à sua degradação oxidativa, contribuírem para a produção de energia metabólica. Atualmente, cerca de 700 aminoácidos foram já descobertos nos sistemas biológicos; no entanto, é dada especial importância a um grupo de 20 deles, pois estão envolvidos no processo de síntese de péptidos e proteínas (Quintas, Freire e Halpern, 2008). A estrutura geral de um aminoácido apresenta um grupo amina e um grupo carboxilo ligados ao carbono  $\alpha$ , que é um carbono central, estando a este também ligado um hidrogénio e a uma cadeia lateral, representada pela letra R, como mostra a figura 1. A cadeia R é variável, distinguindo os 20 aminoácidos (Campbell, 2000). Este grupo é definido através de, pelo menos, um codão específico do código genético do DNA, existindo 20 para os quais os codões de DNA são conhecidos (Devlin, 1997).



**Figura 1.** Estrutura geral de um aminoácido (retirado de Devlin, 1997).

A síntese de aminoácidos é um processo que ocorre em várias etapas: formação de amoníaco, a incorporação de  $\text{NH}_3$  num composto orgânico – aminação redutora; a síntese do esqueleto carbonado dos aminoácidos, ou seja, a formação dos  $\alpha$ -cetoácidos correspondentes e, por fim, a transferência do grupo amina do ácido glutâmico para os cetoácidos, designada por transaminação (Campos, 1999).

Apesar das plantas e de outros organismo fotossintéticos terem a capacidade de sintetizar os 20 aminoácidos comuns das proteínas a partir de substâncias minerais, os

mamíferos não detêm essa capacidade, precisando que alguns aminoácidos lhes sejam fornecidos pela alimentação, sendo esses designados por aminoácidos essenciais (os que o organismo consegue sintetizar serão os não essenciais). Estes estão apresentados na tabela 1 (Campos, 1999).

Essenciais	Não essenciais
Argina*	Alanina
Histidina	Asparagina
Isoleucina	Aspartato
Leucina	Cisteína
Lisina	Glutamato
Metionina	Glutamina
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptofano	Serina
Valina	Tirosina

**Tabela 1- Aminoácidos essenciais e não essenciais (adaptado de Voet, Voet e Pratt, 2006).**

\* Apesar de a Arginina ser sintetizada por mamíferos, a maior parte é degradada em ornitina e ureia, por isso é necessária em maiores quantidades do que aquelas que os organismos conseguem produzir.

## **2. Metabolismo dos aminoácidos**

O metabolismo celular deve ser constante e moldado às necessidades da célula, que dependem do meio ambiente em que se encontram, podendo estas, no entanto, terem de ser adaptadas às modificações que ocorrem no meio extracelular (Quintas, Freire e Halpern, 2008).

O metabolismo dos aminoácidos é um processo compreendido por um conjunto de reações de síntese e degradação, em que estes funcionam como precursores dos polipéptidos ou são degradados para a produção de energia. Os aminoácidos sofrem transformações distintas no que respeita ao metabolismo dos hidratos de carbono ou dos

lípidos, uma vez que só os primeiros envolvem o elemento azoto (Voet, Voet, Pratt, 2006).

Os átomos de azoto constituintes dos aminoácidos provêm do  $\text{NH}_3$ , originado a partir do azoto atmosférico ou da redução dos nitratos do solo. No entanto, os animais não conseguem nem incorporar o azoto atmosférico nem o azoto orgânico e a maioria das plantas e dos microrganismos utiliza os nitratos como fonte única de azoto, retirando-o diretamente do solo, já que aqui os nitratos são reduzidos a amoníaco. É possível extrair os nitratos do solo através da degradação das substâncias orgânicas azotadas ou do azoto provindo das descargas elétricas. O principal produto da fixação do azoto é o  $\text{NH}_3$  que pode ser utilizado em todos os organismos (Campos, 1999; Quintas, Freire e Halpern, 2008).

Os esqueletos carbonados que se produzem a partir dos aminoácidos degradam-se, podendo formar vários produtos metabólicos, tais como acetil-CoA, acetoacetyl-CoA,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e oxaloacetalato. Dependendo das necessidades do organismo, os aminoácidos têm como destino a síntese de ácidos gordos, a produção de glicose ou a regeneração de energia (Mckee e Mckee, 2003).

O catabolismo dos aminoácidos inicia-se com uma reação de transaminação, como se pode visualizar na figura 2, em que se verifica a transferência reversível do grupo amino do aminoácido para o  $\alpha$ -cetoácido, reação catalisada pelas aminotransferases (ou transaminases) que se encontram vulgarmente no músculo, coração, fígado, cérebro e rim. Este processo é reversível permitindo degradar e sintetizar aminoácidos. Seguida da transaminação, dá-se a desaminação, onde ocorre a remoção do grupo  $\alpha$ -amino do aminoácido (desidrogenação do aminoácido) sendo catalisado por aminoácido oxidases mitocondriais que exibem especificidades diferentes no fígado, cérebro, rim e músculo. Os  $\alpha$ -cetoácidos resultantes serão utilizados em várias vias biossintéticas, ou seja, permitem interligar a desaminação oxidativa com a transaminação, intervir no

metabolismo dos aminoácidos e hidratos de carbono e são utilizados também na produção de energia. O processo mais geral da reação de desaminação encontra-se representado na figura 3. No entanto existem processos particulares sofridos por determinados aminoácidos (serina, treonina e cisteína), em que estes são convertidos diretamente em amoníaco, sendo o produto final o ácido pirúvico (desaminação da serina e cisteína) ou o ácido  $\alpha$ -cetobutírico (desaminação da treonina). Para este processo são utilizadas as enzimas desidratases (pois a desaminação é precedida de uma desidratação). A figura 3 ilustra a reação de transaminação. (Halpern, 1997; Campos, 1999).

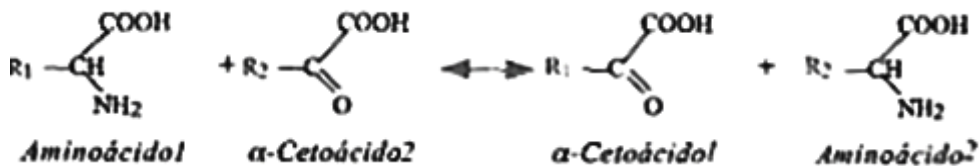


Figura 2. Reação de transaminação (retirado de Campos, 1999).

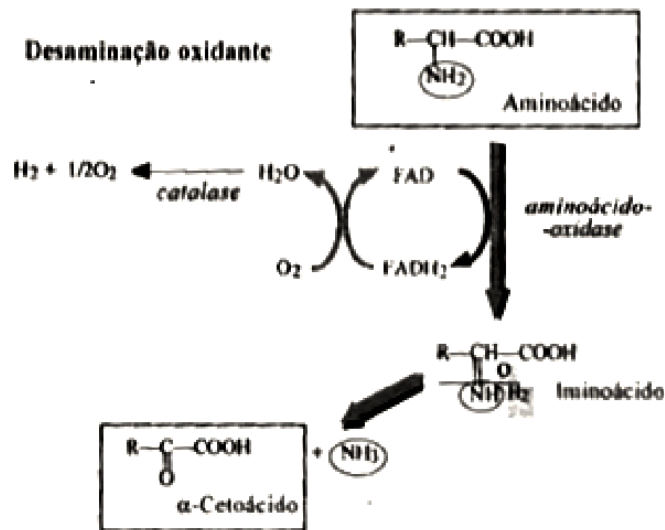


Figura 3. Desaminação oxidativa (retirado de Campos, 1999).

## 2.1 Síntese da ureia

A maioria dos animais terrestres excreta o azoto do grupo amónia na forma de ureia (ureotélicos), sendo o  $\text{NH}_3$  convertido em  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$  nas mitocôndrias dos hepatócitos através do ciclo da ureia. A formação de ureia partir da amónia é processada na presença dos aminoácidos ornitina, citrulina e arginina. Na formação da ureia ocorre um processo cíclico no qual a ornitina se combina com um grupo carbamoil, formando a citrulina. Seguidamente, esta última reage com o aspartato originando a argininossuccinato. Este último, é clivado em fumarato e arginina, sendo esta hidrolisada com libertação de ureia e formação de ornitina (Lehninger, Nelson e Cox, 1995). Este processo está representado na figura 4.

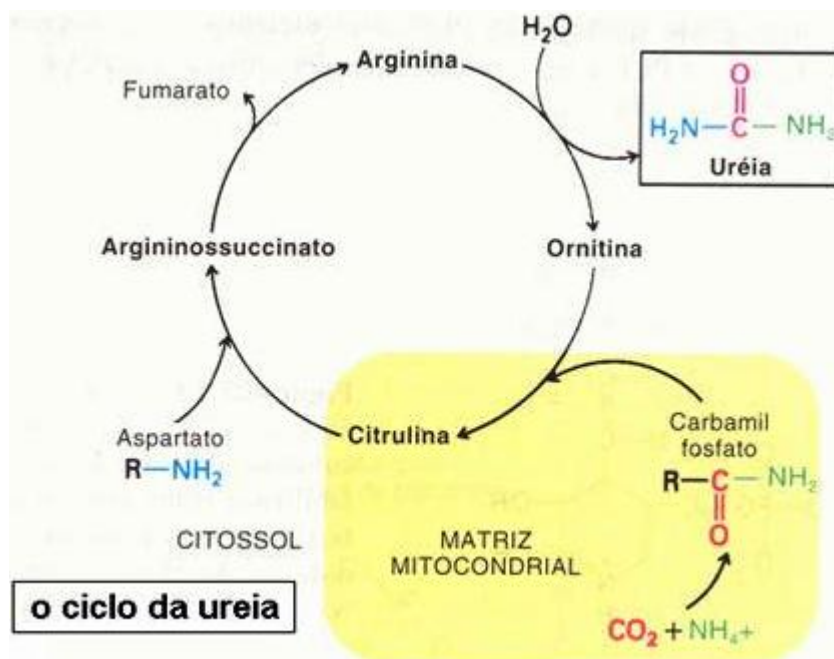


Figura 4. Ciclo da ureia (retirado de Stryer, 1995).

### 3. Erros inatos do metabolismo

A evolução da ciência ao longo do tempo permitiu um estudo aprofundado em determinadas áreas, nomeadamente, a do genoma humano. Graças a esta inovação, foi possível a descoberta da origem de determinadas doenças de foro genético, concluindo-se que estas tinham como base genes mal codificados. O conhecimento existente sobre os erros inatos do metabolismo é um exemplo dos resultados do avanço científico na área da genética (Chunli e Ronald , 2006).

Os erros inatos do metabolismo (EIM) definem-se como uma condição genética onde os genes que codificam enzimas envolvidas em vias metabólicas estão mutados (Regaleiro, 2007). Tal situação, leva a uma deficiência na atividade de uma enzima responsável por um determinado passo no processo metabólico. Os processos afetados podem acontecer nas vias metabólicas dos hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos orgânicos, purinas e pirimidinas, lípidos e ácidos biliares.

Individualmente, a incidência dos erros inatos do metabolismo é rara, havendo 30 EIM para cada 100000 nascimentos, mas quando considerada coletivamente é muito frequente (Constantinou *et alii*, 2004).

Os erros inatos do metabolismo são a principal causa genética de morte à nascença e na infância. Podem ser autossómicos ou ligados ao cromossoma X e o gene mutado pode ser dominante ou recessivo. Caso o gene mutado seja dominante, todo o indivíduo que o possua é afetado pela doença, concluindo-se que tem, pelo menos, um parente igualmente padecente da doença; estes são indivíduos homozigóticos. Contudo, se o gene deficiente é recessivo, estará silencioso e a doença não se irá manifestar, a menos que o código genético paterno e materno contenha o gene mutado; trata-se de indivíduos heterozigóticos. (Marín-Valencia *et alii*, 2010; Gaw *et alii*, 2004).

Basicamente, qualquer EIM resulta de (Gaw *et alii*, 2004):

- Acumulação do substrato;
- Deficiência em produto;
- Variedade de metabolitos intermediários;
- Falta de feedback negativo;
- Falha nos mecanismos de transporte;

Normalmente, o substrato é transportado para a célula com a ajuda de um transportador, sendo este convertido em produto. No entanto, havendo deficiência de um transportador de uma enzima ou de um cofator, não existe transporte para a célula nem conversão de substrato em produto, ocorrendo a acumulação do primeiro, o que provoca efeitos a nível sistémico. Normalmente, o substrato é convertido em produto, mas como se irá verificar uma acumulação de produto obtida em caso de perda da inibição do *feedback*, ocorrerá também acumulação de metabolitos intermediários. Caso se verifique uma deficiência na enzima ou no cofator, o metabolismo desencadeia-se através de uma via alternativa, produzindo metabolitos tóxicos que exercerão efeitos a nível sistémico. Todos estes pontos estão resumidos na figura 5 (Rao *et alii*, 2009).

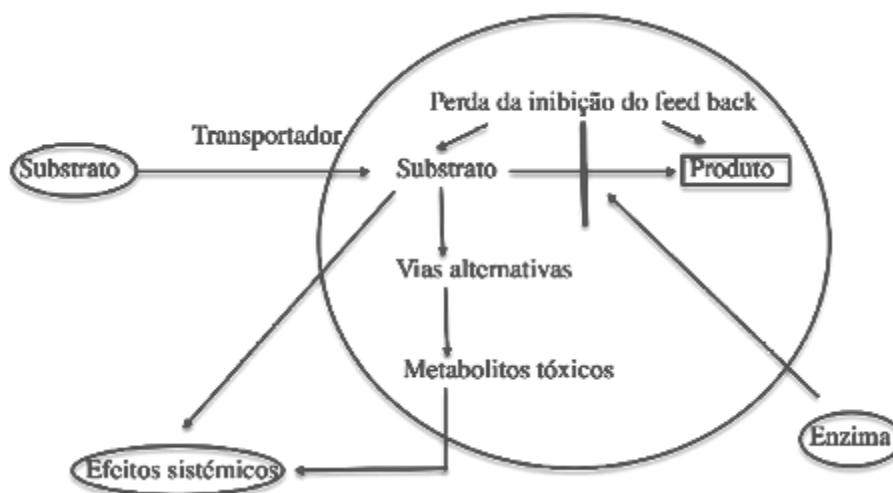


Figura 5. Diagrama representativo das causas e consequências das desordens metabólicas (adaptado de Rao *et alii*, 2009).

### **3.1 Classificação dos erros inatos do metabolismo**

Os erros inatos do metabolismo são divididos em duas categorias. A categoria 1, que representa todas as alterações que afetam um único sistema orgânico ou um órgão, como por exemplo, o sistema imunológico ou os túbulos renais e a categoria 2 que engloba as doenças originadas por um defeito na via metabólica. Esta última categoria é ainda dividida em três grupos:

Grupo I- Distúrbios de síntese ou catabolismo de moléculas complexas: podem ser doenças lisossomais, tais como as mucopolissacaridoses ou as esfingolipidoses. Os sintomas gerais deste grupo de distúrbio caracterizam-se por fácies grosseiro, dismorfias, visceromegalias ou neurodegeneração, de acordo com a localização da acumulação.

Grupo II- Engloba doenças como aminoacidopatias, defeitos nos ácidos orgânicos e do ciclo da ureia e a intolerância aos açúcares. Os sintomas aparecem entre intervalos, têm uma relação evidente com o aporte alimentar e levam geralmente a intoxicação aguda e recorrente ou crónica e progressiva.

Grupo III- Este grupo engloba as doenças provenientes da alteração de produção e consumo energéticos, provenientes do distúrbio do fígado, miocárdio, músculo e cérebro. Os sintomas clínicos associados são hipoglicemia, hipotonia generalizada, miopatia, insuficiência cardíaca, atraso no crescimento ou morte súbita. Entre as doenças mais conhecidas deste grupo estão as glicogenoses, hiperlactemias congénitas, doenças mitocondriais da cadeia respiratória e defeitos na oxidação dos ácidos gordos (El Husny e Fernandes-Caldato, 2006).

### 3.2 Diagnóstico

Os primeiros sinais e sintomas dos EIM são muito gerais, podendo facilmente serem confundidos com distúrbios ou doenças de diferente origem (Marín-Valencia et alii, 2010). Podem incluir episódios de descompensação metabólica, sintomas neurológicos, atraso no desenvolvimento do organismo, problemas na aprendizagem ou a nível comportamental (Stacy *et alii*, 2012). A tabela 2 explica, de uma forma geral, um caso de EIM.

<b>Sintomas indicativos de EIM</b>	<b>Sintomas/sinais indicativos de forte possibilidade de EIM</b>
Bebé doente durante mais tempo que o normal, podendo a patologia prolongar-se durante semanas	Vómitos/ náuseas recorrentes e persistentes
Bebé ou recém-nascido com convulsões e/ou hipotonia, especialmente se não tratáveis	Historial familiar com morte ou doença, especialmente entre irmãos
Recém-nascido/ criança com odor anormal	Dificuldade em estabilizar o peso
	Apneia e dificuldade em respirar
	Icterícia ou hepatomegalia
	Consanguinidade parental
	Sépsia (particularmente <i>E. coli</i> )
	Letargia
	Coma

**Tabela 2. Sintomatologia indicativa de EIM (Adaptado de Rao, *et alii*, 2009).**

Quando se estuda um caso de erro inato do metabolismo, devem ser focados alguns aspetos considerados determinantes na avaliação da doença, tais como:

Historial familiar - Devem verificar-se os familiares em que tenha sido diagnosticada a doença. Verificar se os progenitores do recém-nascido têm ambos o gene defeituoso que origina a patologia, investigando também casos de nados mortos, abortos espontâneos e patologias recorrentes nas últimas duas gerações familiares.

Avaliação física- Dermatites, alopecia, dismorfias faciais são características de um EIM.

Testes de diagnóstico essenciais- Hemograma completo, determinação de glucose, amónia, lactato, proporção de lactato/piruvato, ácidos orgânicos, aminoácidos, substâncias redutoras, cetonas e análise do nível de eletrólitos são testes a elaborar num processo de diagnóstico de um EIM.

Testes de controlo avançados- Devem realizar-se análises aos ácidos gordos de cadeia longa, separação e especificação dos mucopolissacarídeos, quantificação dos aminoácidos, ácidos orgânicos, hidratos de carbono ou outros metabolitos.

Testes definitivos de diagnóstico- Que incluem deteção da enzima deficiente no sangue, plasma, leucócitos e eritrócitos, sendo necessários também imunoensaios e análise do DNA para verificar a mutação no genoma (Rao *et alii*, 2009). P 215

O facto dos sintomas associados poderem ser relacionados com outro tipo de patologia, a baixa incidência destes distúrbios, que leva por isso à falta de experiência dos profissionais de saúde neste este tipo de casos, e também a necessidade de testes especiais confirmatórios da doença tornam o diagnóstico dos EIM desafiante (Rao *et alii*, 2009).

### 3.2.1 Programa de triagem neonatal

Com vista a reduzir as consequências inerentes aos EIM, foi necessário implementar uma nova medida de saúde pública. Tal medida tem como objetivo reduzir e prevenir mais casos clínicos de erros inatos de metabolismo e seus sintomas associados e também atenuar as taxa de morbidade e mortalidade. Nos anos 70 foi implementado em Portugal o programa de triagem neonatal, permitindo um diagnóstico eficaz e económico (Couce *et alii*, 2011; Constantinou, *et alii*, 2004).

O programa de triagem neonatal define-se como a aplicação sistemática de um teste ou inquérito para identificar os indivíduos em risco de um transtorno específico para justificar a investigação ou ação preventiva direta, entre pessoas que não procuraram atendimento médico por conta dos sintomas dessa doença (Leonard e Desateux 2010).

As convencionais técnicas de deteção utilizadas, tais como ensaios específicos enzimáticos e cromatografia gasosa/espectrometria de massa são sensíveis, no entanto necessitam de demasiado tempo, envolvendo também mais trabalho na preparação das amostras. Além disso, não são de deteção geral, ou seja, detetam poucas patologias a partir de uma só amostra. A espectrometria de massa *tandem* é uma técnica revolucionária que se tem revelado muito eficaz, sensível e específica, sendo a utilizada na maioria dos países. Utilizando amostras de sangue, é possível detetar 30 compostos em dois ou três minutos, incluindo aminoácidos e acilcarnitinas. Assim, é possível detetar vários erros inatos do metabolismo intermediário tais como aminoacidopatias, galactosemias, acidúrias orgânicas e desordens associadas à oxidação dos ácidos gordos (Couce *et alii*, 2011; Constantinou, *et alii*, 2004).

A espectrometria de massa *tandem* é então uma poderosa ferramenta que permite explorar as alterações nos padrões de metabolitos encontrados nos fluidos biológicos e conhecer o mecanismo bioquímico associado à doença. O diagnóstico é feito em fluidos

biológicos, tais como sangue ou urina, sendo, no entanto, o primeiro a amostra adotada na maioria dos países, visto a colheita de urina ser mais difícil. A colheita da amostra é baseada no método de Guthrie, em que o sangue das amostras é seco em papel de filtro (Constantinou, *et alii*, 2004).

Caso os resultados das análises sejam anormais e propícios à presença de uma desordem metabólica, os pacientes passam então para a fase mais avançada do diagnóstico, partindo para testes mais específicos; caso estejam fora da linha dos valores de referência, mas não suficientemente claros acerca da presença de uma desordem, uma segunda amostra será colhida e uma segunda análise será efetuada (Couce *et alii*, 2011). Apesar de tudo, a espectrometria de massa *tandem* tem as suas desvantagens, nomeadamente, o custo do equipamento associado, que é elevado. Além disso, é necessário pessoal especializado que saiba interpretar os dados produzidos pela técnica. Adicionalmente, muitos dos metabolitos detetados com nível elevado podem corresponder a desordens diferentes, portanto é necessário uma grande capacidade da interpretação dos resultados (Jones e Bennet, 2002).

### **3.2.2 Testes de confirmação**

A última fase do diagnóstico dos EIM é constituída pelos testes de confirmação, em que são feitas análises adicionais, tais como quantificação de aminoácidos, determinação da atividade da enzima que se suspeita que seja deficiente ou então a análise ao genoma para identificar a mutação (Amâncio, Salco e Coelho, 2007).

### **3.3 Perspetiva histórica**

Foi na primeira década do séc. XX que Archibald Garrod descobriu o primeiro EIM, a alcaptonúria. Inicialmente, o diagnóstico era feito de grosso modo, sendo baseado em acentuadas anormalidades, por exemplo, no caso da alcaptonúria, a presença da urina com tom escuro. De uma forma geral, indivíduos severamente doentes, com características dismórficas ou aberrações mentais, e com historial familiar de doença eram sugestivos de casos de EIM (Benett e Jones, 2002).

Com a identificação das enzimas específicas e dos processos metabólicos, foi possível concluir que a doença provém de desordens hereditárias. Ao mesmo tempo que Garrod desenvolvia e oficializava esta teoria, um mecanismo assente na genética estava a ser descoberto e elucidado, tendo Beadle e Tatum dado a conhecer ao mundo científico o conceito “em gene, uma enzima”. Esta teoria defendia que uma unidade hereditária chamada gene era responsável pela presença e ao mesmo tempo pela atividade de uma determinada enzima. A partir daqui, o diagnóstico era direcionado através dos genes que estavam alterados e que produziam enzimas deficientes. Foi em 1960 que Guthrie desenvolveu o primeiro método de diagnóstico, relativo à fenilcetonúria, medindo a fenilalanina em amostras de sangue em papel de filtro, através de um ensaio de inibição enzimática (Benett e Jones, 2002). Em 1909 foi publicado o primeiro livro de Garrod intitulado “Erros Inatos do Metabolismo” descrevendo o albinismo, a cistinúria, a pentosúria e a alcaptonúria (Barić, Fumić e Hoffmann, 2001).

### **3.4 Tratamento**

O tratamento relativo aos EIM tem sido alvo de grandes avanços nas últimas décadas devido ao progresso no esclarecimento relativo à fisiopatologia envolvida nestas

desordens, o que permitiu a descoberta de relevantes formas de tratamento que atenuam a doença e os sintomas associados (Alfadhel *et alii*, 2013).

A dieta constitui o tratamento geral dos EIM, tendo contudo as suas limitações (como será visto adiante). Outras opções de tratamento têm sido testadas e utilizadas, tais como remoção do substrato quando este se encontra em concentrações tóxicas no organismo, suplementação com coenzimas, terapia de substituição enzimática, reposição do produto que resultaria da via metabólica afetada, através de terapias farmacológicas e, por fim, transplante de medula, fígado ou rim. Antes de aplicar determinado tratamento, é necessário analisar minuciosamente o mecanismo que originou a patologia e a partir daí avaliar qual o tratamento mais conveniente (Campeau, Scriver e Mitchell, 2008).

## **II. DISTÚRBIOS NO METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS**

Cada processo metabólico envolve uma série de etapas catalíticas em sequência, sendo essas etapas mediadas por enzimas, que são por sua vez, codificadas por genes. Como é sabido, o organismo difere de ser humano para ser humano, por isso, é um facto a variação na atividade enzimática de cada um. No entanto, dentro da diversidade de cada um, há uma pequena variante que é causadora de doença. Os distúrbios metabólicos estão classificados de forma diferente:

- Efeitos patológicos do bloqueio da via: ausência do produto final, acumulação do substrato;
- Diferentes classes funcionais de proteínas (exemplo: recetores de hormonas);
- Cofatores associados (exemplo: metais, vitaminas);
- Vias afetadas (exemplo: glicólise, ciclo de ácido cítrico) (Jorde *et alii*, 2004).

#### **4. Os distúrbios no metabolismo dos aminoácidos em Portugal**

Com a introdução da espetrometria de massa, nos últimos anos, verificou-se uma considerável revolução nos programas de triagem neonatal em Portugal. Com a introdução deste método de diagnóstico, foi possível detetar 25 desordens de metabolismo num único teste, enquanto que antes eram detetadas apenas duas. Assim, verifica-se, um aumento na taxa de deteção das desordens metabólicas à nascença (Vilarinho *et alii*, 2010).

A seguir, apresentam-se os mais frequentes distúrbios de aminoácidos detetados em Portugal, sendo eles: fenilcetonúria, hiperfenilalaninemia, doença da urina do xarope de bordo (leucínose), tirosinemia tipo I, tirosinemia tipo II, homocistinúria e deficiência de metionina adenosiltransferase.

Os principais aspetos destas desordens irão ser desenvolvidos ao longo deste trabalho, à exceção da fenilcetonúria, visto já ter sido descrita por numa dissertação apresentada anteriormente. No entanto, será abordada numa forma geral por estar relacionada com hiperfenilalaninemia.

##### **4.1. Hiperfenilalaninemia**

A hiperfenilalaninemia(HPA) é uma doença autossómica recessiva originada pela deficiência na enzima fenilalanina hidroxilase ou do cofator tetra-hidrobiopterina (BH4). Quando tal acontece, não existe hidroxilação da fenilalanina (Phe) a tirosina, levando à acumulação da primeira no plasma e dos seus metabolitos nos fluidos biológicos e tecidos, como se pode perceber pela observação da via metabólica na figura 6.

A origem da doença inicia-se na mutação no gene que codifica a enzima fenilalanina oxidase (PAH) no cromossoma 12 (12q22q24). Através da análise do genoma mais de 600 mutações foram já identificadas, a maior parte delas são *missense* e numa condição heterozigótica (Trunzo *et alii*, 2013; Zimmermann *et alii*, 2012).

#### **4.1.1 Fenilalanina**

A fenilalanina é um aminoácido essencial, sendo portanto obtido a partir da dieta e ingestão calórica, volume de proteína endógena, catabolismo e incorporação em proteínas. Após absorção, é convertido noutra aminoácido, a tirosina através da enzima fenilalanina hidroxilase e do cofator tetra-hidriobiopterina (BH4) (Blau *et alii*, 2009).

#### **4.1.2. Tetra – hidrobiopetrina (BH4)**

A BH4 é um cofactor importante envolvido na síntese da tirosina, L-DOPA, 5-hidroxitriptofano (5-HTP), óxido nítrico e glicerol. A BH4 é sintetizada a partir da guanosina trifosfato, pelas enzimas guanosina trifosfato ciclo-hidrolase I, 6-piruviltetra-hidropterina sintase e sepiapterina redutase. Depois de reagir com o aminoácido aromático hidroxilase sofre oxidação a pterina-4 $\alpha$ -carbinolamina e, seguidamente, é regenerada pelas enzimas pterina-4 $\alpha$ -carbinolamina desidratase e di-hidropteridina redutase a BH4. A deficiência no cofactor deve-se às enzimas envolvidas no processo de síntese ou regeneração e causa, para além de HPA, sinais e sintomas a nível neurológico visto que está envolvido na síntese de serotonina e L-DOPA (Niu, 2011).

### 4.1.3 Via metabólica da fenilalanina

O metabolismo da fenilalanina começa com a sua hidroxilação a tirosina, processo catalisado pela fenilalanina hidroxilase, requerendo esta reação o cofator BH<sub>4</sub> que funciona como redutor. Seguidamente, a tirosina sofre uma reação de transaminação formando *p*-didroxifenilpiruvato, um  $\alpha$ -cetoácido, reação esta catalisada pela enzima tirosina aminotransferase. Posteriormente, o *p*-hidroxifenilpirovato reage com O<sub>2</sub> formando ácido homogentísico, sendo este processo catalisado pela enzima *p*-hidroxifenilpiruvato oxidase. Este último composto formado é clivado pelo O<sub>2</sub>, na presença da enzima homogentisato oxidase, é convertido a maleilacetoacetato. Este sofre isomerização de *cis* para *trans* e é convertido em fumarilacetoacetato pela enzima maleilacetato isomerase. Finalmente, o fumarilacetoacetato é clivado formando fumarato e acetoacetato numa reação de hidrólise catalisada pela enzima fumarilacetoacetato hidrolase, como ilustra na figura 6 (Stryer, 1995; Devlin, 1997; Jorde *et alii*, 2004).

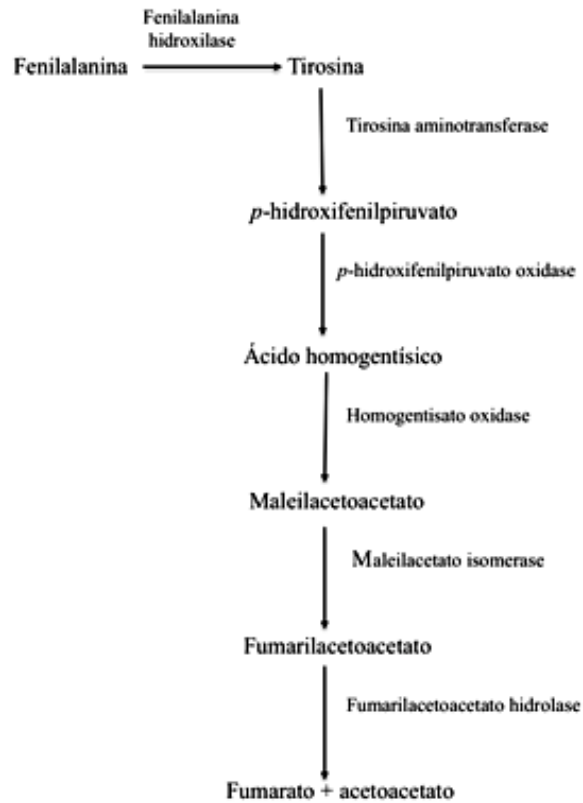


Figura 6. Via principal do metabolismo da fenilalanina (adaptado de Jorde *et alii*, 2004).

#### 4.1.4 Fenilcetonúria e HPA

A HPA inclui a fenilcetonúria (PKU), sendo o EIM mais comum entre a população caucasiana, com uma incidência de 1 em cada 10000 indivíduos (Rivera *et alii*, 2011).

A mutação do gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) origina um espectro de fenótipos que se definem de acordo com a concentração de Phe no organismo, apresentada na tabela 3, originando tipos de hiperfenilalaninemias diferentes: PKU clássica (I), PKU moderada (II) e HPA suave (III) (Trunzo *et alii*, 2013; Zimmermann, *et alii*, 2012).

Tipo HPA	Níveis Phe no sangue (mg/dl)
PKU clássica (I)	>20
PKU moderada (II)	10 a 20
HPA suave (III)	2 a 10

Tabela 3- Tipos de HPA e concentrações correspondentes (adaptado de Trunzo *et alii*, 2013).

#### 4.1.5 Aspetos clínicos

A fenilcetonúria não tratada leva a sintomas graves, tais como atraso intelectual, eczema cutâneo, autismo, convulsões, deficiência motora, problemas ao nível do desenvolvimento, comportamento aberrante e defeitos neuropsicológicos (Blau, Spronsen e Levy, 2010).

#### 4.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da HPA é feito através de programas de triagem neonatal. Caso o resultado seja positivo, o teste terá de ser confirmado, visto que o diagnóstico é feito no recém-nascido e quando se trata dos prematuros, especialmente, há a possibilidade da enzima estar ainda imatura e não manifestar a sua atividade, originando níveis elevados de fenilalanina no sangue. Também deve haver cuidado na análise dos resultados nos recém-nascidos doentes, em casos de nutrição parentérica ou quando ocorreu uma transfusão de sangue (Trunzo *et alii*, 2013).

Robert Guthrie desenvolveu o primeiro teste de diagnóstico para HPA, que se revelou muito eficaz. O teste consistia num ensaio de inibição bacteriana que se baseava no facto das *Bacillus subtilis* necessitarem da fenilalanina para o seu crescimento. As amostras de sangue são obtidas no hospital ou no consultório médico e depois enviadas

para os laboratórios. Este é um método muito útil para a triagem em massa (Blau *et alii*, 2011).

Como já referido anteriormente, a espectrometria em massa *tandem* é o método mais eficaz para o diagnóstico, já que permite determinar concentrações de aminoácidos com elevado grau de confiança, em pequenos volumes de sangue ou plasma. Além disso, este método produz poucos falsos positivos, pois mede os níveis de Phe e tirosina (Tyr) e a proporção Phe/Tyr, diminuindo a utilização de outros recursos, para além de permitir detetar outros EIM. O rastreio deve ser feito nos primeiros dias de vida, de modo a serem tomadas medidas em caso positivo. Geralmente, as amostras de sangue são recolhidas do segundo ao quinto dia de vida do recém-nascido, no entanto, a triagem pode acontecer até aos sete dias de vida (Blau *et alii*, 2011).

#### a) Diagnóstico diferencial

Para um correto e eficaz diagnóstico existem análises importantes que têm de ser efetuadas: análise à neopterina, biopterina na urina e medição da di-hidropterina redutase (DHPR) no sangue. O teste de pesquisa de BH4 e a medição de neurotransmissores, pterinas e folatos no líquido cefalorraquidiano fornecem informações acerca da severidade da doença (Blau *et alii*, 2011; Spaapen e Rubio-Gozalbo, 2002).

#### b) Teste de pesquisa do cofator BH4

O teste de pesquisa do cofator BH4 tem como finalidade distinguir a causa de HPA, ou seja, se se deve à deficiência na enzima PAH ou no cofactor BH4. Quando a origem se deve à mutação no gene, a resposta a BH4 é pobre, no entanto, quando o problema é a nível do cofator há uma boa resposta ao teste de pesquisa. Este teste é feito para diferenciar o tipo de tratamento a ser aplicado (Pérez-Dueñas *et alii*, 2004).

Este método consiste na administração por via oral de 20 mg/kg de cofator BH4. Os níveis de Phe no sangue são medidos antes da administração oral de BH4 e 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas depois. Um resultado positivo para BH4 consiste numa diminuição de 30 % na concentração de Phe. O teste deve ser feito logo que o bebé seja admitido no hospital com suspeita de desordem metabólica (Feillet *et alii*, 2008).

#### **4.1.7 Tratamento**

Primeiramente, o mais importante é a rapidez com que se inicia o tratamento, que deve acontecer logo que se detete a presença da HPA. O tratamento convencional para a HPA consiste numa dieta vegetariana com baixa ingestão de Phe, suplementada com uma fórmula “Phe-free”, contendo aminoácidos essenciais e não essenciais que compensam a falta de proteína, não necessitando assim de ingerir alimentos altamente proteicos, tais como, laticínios, carne e peixe. Estes suplementos oferecem maior tolerabilidade e são mais convenientes para os pacientes. No entanto, apesar destas medidas terem como objetivo eliminar os sintomas associados à HPA, têm efeitos secundários associados à dieta restritiva, tais como atraso no crescimento, desenvolvimento precoce, osteopenia/osteoporose, entre outros. Além disso, a adesão à dieta tem tendência a diminuir conforme a faixa etária, sendo difícil de manter, principalmente, na puberdade. A dieta deve começar até às duas semanas após o nascimento, sendo que o objetivo do tratamento é atingir uma concentração de Phe entre 120 - 360  $\mu\text{mol/L}$  nos primeiros 10-12 anos de vida, apesar de estes padrões variarem entre países. Quanto à concentração no adulto ainda não está estipulada, sendo que se verifica que é necessário retomar a dieta de acordo com o seu comportamento (caso apresente sintomas) (Blau *et alii*, 2009; Bueno *et alii*, 2012).

Nas últimas décadas têm sido desenvolvidos novos métodos de tratamento, tais como terapia com BH<sub>4</sub>, suplementação com aminoácidos, terapia génica ou ainda tratamento com enzimas de substituição (Bueno *et alii*, 2012).

Kure *et alii*, verificaram *in vivo* que a concentração de Phe desce com a suplementação com BH<sub>4</sub>; tal foi confirmado através do teste de pesquisa deste cofator, concluindo-se assim que um terço dos indivíduos doentes testados poderiam ser tratados desta forma. O tratamento tem sido utilizado ao longo dos anos, mantendo os níveis de Phe estáveis, podendo ser realizado como monoterapia ou em combinação com dieta (Aguado *et alii*, 2007).

Através do teste de pesquisa de BH<sub>4</sub>, é possível diagnosticar os diferentes tipos de HPA e, de acordo com isso, indicar o tratamento correto adequado. Desta forma, para a PKU clássica (I) deve ser seguida uma dieta restrita em Phe, uma vez que não responde ao BH<sub>4</sub>. Para a PKU moderada (II) recomenda-se uma terapia de substituição com BH<sub>4</sub>, enquanto que para HPA suave nenhum dos tratamentos referidos acima é aplicado (Lücke *et alii*, 2003).

#### **4.2 Tirosinemia tipo I**

A tirosinemia tipo I (HT1) é uma doença autossómica hereditária caracterizada pela deficiência da enzima fumarilacetoacetase (FAH), que catalisa o último passo da via metabólica da degradação da tirosina, levando à acumulação de succinilacetona (SA), fumarilacetoacetato e maleilacetoacetato (Imtiaz *et alii*, 2011).

Estima-se que a incidência deste distúrbio no mundo esteja compreendida entre 1 para 50000000 e 1 para 120000 nados vivos. A mutação relativa ao gene FAH está localizada no cromossoma 15q25.1 que codifica 419 proteínas pertencentes aos hepatócitos (Imtiaz *et alii*, 2011; Runick e Ebach, 2004).

A HT1 é uma doença bastante severa, causando problemas a nível hepático, renal e neurológico (Demers *et alii*, 2003).

#### **4.2.1 Aspetos clínicos**

O distúrbio ocorre sob duas formas, aguda e crónica, classificadas de acordo com a gravidade da doença e/ou idade. A forma aguda caracteriza-se por falha hepática nos primeiros meses de vida, levando à morte caso não seja tratada. A função hepática é disfuncional originando hepatomegalias, icterícia, ascite e sangramento gastrointestinal. Quanto à forma crónica, desencadeia disfunção renal tubular, doença hepática crónica e ainda raquitismo hipofosfatémico. Apesar de terem diferentes consequências, ambas proporcionam risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, lesão hepática, fibrose, colapso do parênquima com fibrose extensa, que se manifesta por vezes à nascença, e cirrose hepática, mas com regeneração acentuada do fígado (Imtiaz *et alii*, 2011; Demers *et alii*, 2003).

#### **4.2.2 Tirosina**

A tirosina é um aminoácido semi-essencial obtido a partir da hidrólise das proteínas da dieta ou das proteínas contidas nos tecidos ou ainda da hidroxilação da fenilalanina. Este aminoácido pode ser incorporado nas proteínas ou degradado em fumarato, que irá participar no ciclo de Krebs, ou em acetoacetato, uma cetona. A tirosina é metabolizada nos hepatócitos e no túbulo proximal do rim, envolvendo uma série de enzimas. A deficiência em qualquer uma das enzimas envolvidas no catabolismo da tirosina origina a acumulação deste aminoácido nos tecidos, líquido encefalorraquidiano, sangue e urina.

As desordens associadas à tirosina envolvem três enzimas, sendo classificadas como tirosinemia tipo I (deficiência na fumarilacetoacetato hidrolase), tipo II (deficiência na tirosina aminotransferase) e a tipo III (deficiência na enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase) (Sgaravatti *et alii*, 2008).

#### 4.2.3 Via metabólica envolvida

O metabolismo da tirosina envolve cinco enzimas com expressão unicamente no fígado e no rim. A tirosina é metabolizada a fumarato e acetoacetato que entram no ciclo de Krebs para produzir energia (Mak *et alii*, 2013).

Na tirosinemia tipo I, visto que há deficiência na enzima fumarilacetoacetase hidrolase, ocorre uma acumulação de fumarilacetoacetato e maleilacetoacetato, sendo estes metabolitos tóxicos. Estes serão reduzidos a succinilacetoacetato e depois descarboxilados a succinilacetona. Elevadas concentrações deste último composto no plasma e urina são patogênicas. A HT1 está associada a uma deficiência parcial na enzima 4-hidroxifenilpiruvato, -lactato e -acetato. Os pacientes têm sintomas semelhantes aos da porfiria intermitente aguda devido ao efeito inibitório da succinilacetona na enzima *delta*-aminolevulinica desidratase, levando à acumulação de delta-aminolevulinato como se pode verificar pela figura 7. O fumarilacetoacetato inibe a adenosil metionina sintase, o que conduz aos elevados níveis de metionina em pacientes com HT1 (Mak *et alii*, 2013).

Contudo, a tirosinemia não leva à direta acumulação de tirosina no organismo. O que acontece é a acumulação de fumarilacetoacetato, maleilacetoacetato, succinilacetoacetato e succinilacetona, levando a toxicidade a nível renal e hepático (Rashed *et alii*, 2005).

O metabolismo da tirosina está associado ao metabolismo da fenilalanina, portanto a sua descrição encontra-se no 4.1.3 na página 17.

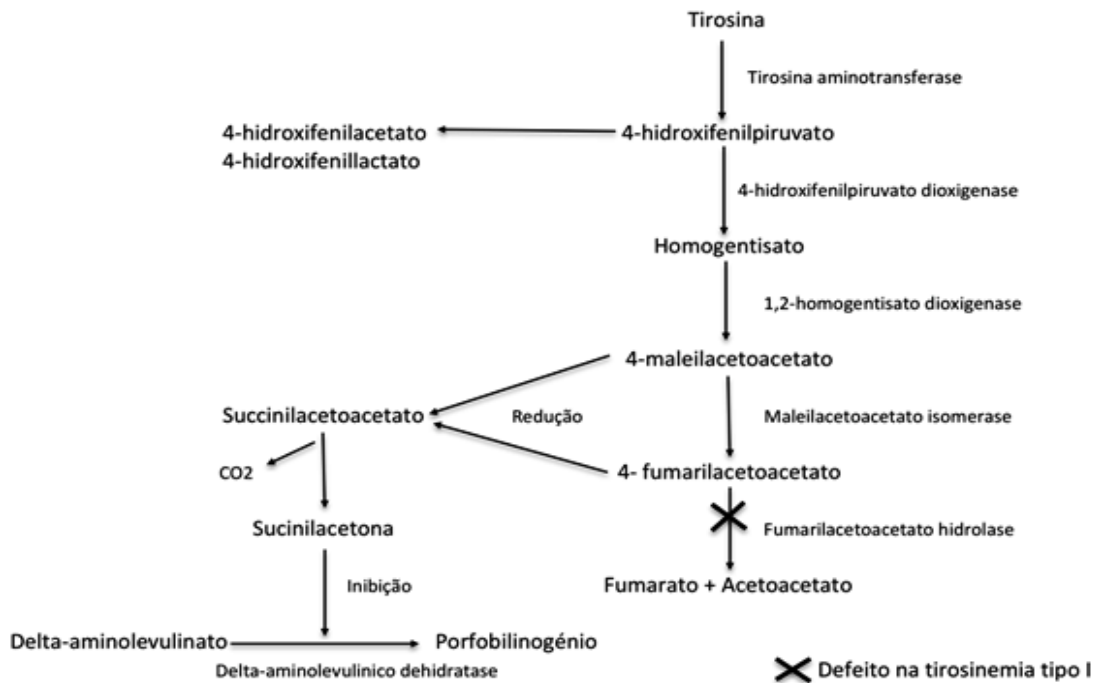


Figura 7. Via metabólica da tirosina, evidenciando o defeito que ocorre na tirosinemia tipo I (retirado de Mak *et alii*, 2013).

#### 4.2.4 Diagnóstico

Os pacientes que sofrem desta desordem metabólica, apresentam valores anormais de determinados parâmetros, nomeadamente, tirosina, transaminases hepáticas, metionina, ácido  $\delta$ -aminolevulínico, 4-hidroxiacetato, estes parâmetros poderiam sugerir um diagnóstico de HT1. Contudo, estas alterações estão também presentes noutra tipo de doenças hepáticas, não sendo portanto marcadores específicos de HT1 (Al-Dirbashi *et alii*, 2006).

Dos metabolitos resultantes do metabolismo da tirosina, a succinilacetona (SA) é o que serve de marcador específico para a deteção da tirosinemia tipo I. Concentrações altas

deste metabolito nos fluidos biológicos sugerem HT1. No entanto, o diagnóstico definitivo da tirosinemia tipo I só é confirmado através de elevados níveis de SA e/ou do seu precursor, succinilacetoacetato (SAA) (Rashed *et alli*, 2005).

Sendo assim, o programa de triagem neonatal básico não é suficiente para detetar tirosinemia tipo I, sendo necessário uma análise complementar para a deteção de SA/SAA (Al-Dirbashi *et alii*, 2010; Metz *et alii*, 2012).

Vários métodos de diagnóstico foram testados, baseando-se nas elevadas concentrações de SA e SAA em fluidos biológicos, tanto na urina como no sangue, tais como:

Método de diluição isotópica em cromatografia líquida-espectrometria de massa *tandem* (LC- ME/ME). Este método utiliza amostras de urina, revelando-se específico e sensível, permitindo detetar níveis baixos de SA. Pode ser considerado como um método de diagnóstico definitivo e também é válido para monitorizar os níveis de SA após terapêutica com 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil-1,3-ciclo-hexanodiona (NTBC) (Rashed *et alli*, 2005).

Determinação de SA por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e derivatização fluorescente. Método reprodutível e preciso utilizando amostras de urina (Al-Dirbashi *et alii*, 2006).

Determinação de SA por eletroforese capilar com amostras de urina, método que se revela rápido, simples e barato (Cansever e Erim, 2005).

Método de espectrometria de *tandem* atômica derivatizado que tem a capacidade de detetar aminoácidos, acilcarnitinas e SA em amostras de sangue, usando um único processo de extração. Este método revela-se eficaz, porque permite reduzir os custos do

trabalho e o trabalho manual. A determinação simultânea de succilactona, aminoácidos e acilcarnitinas usando amostras de sangue é um avanço no diagnóstico da HT1, reduzindo os falsos negativos e falsos positivos e não necessitando de um teste de confirmação (Al-Dirbashi *et alii*, 2006; Dhillon *et alii*, 2011).

Assim, o método de espectrometria de massa *tandem* derivatizado, apesar de se revelar o mais caro em termos de programas de triagem neonatal, tem a vantagem de maximizar o uso dos seus instrumentos, diminuindo o tempo de teste analítico em 85% (Zytkovicz *et alii*, 2013).

#### **4.2.5 Tratamento**

Em 1950 surgiram as primeiras terapias para a HT1 revelando-se, no entanto, ineficazes. Seguidamente surgiu o transplante de fígado e, nas últimas décadas, novas terapias foram desenvolvidas, tais como, dieta restrita em proteínas e suplementos de formulações com baixas concentrações em tirosina, fenilalanina, metionina e nitisinona. Em 1992 foi introduzida uma nova terapêutica que se tem revelado eficaz na maioria dos pacientes, reduzindo consideravelmente a mortalidade e morbidade, a terapia com o fármaco NTBC (Imitiaz *et alii* 2011; Runick e Ebach 2004; Allard *et alii*, 2004)

##### **4.2.5.1 2-(2-nitro-4-trifluormetilbenzoil-1,3-ciclo-hexanodiona (NTBC)**

A administração de NTBC constitui a terapêutica padrão há mais de dez anos. Antes da descoberta desta terapia, a única que se revelava eficaz era o transplante hepático.

Esta molécula pertence a um grupo de compostos usados como herbicidas, mas o NTBC é o único utilizado na terapia de HT1. As suas formas comerciais são Nitisinon ou Orfadin®, servindo também para o tratamento da alcaptonúria, uma doença causada

pela deficiência na enzima homogentisato 1,2-dioxigenase (Sander *et alii*, 2011; Herebian *et alii*, 2009).

Este fármaco é um potente inibidor da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, reduzindo assim a quantidade de metabolitos consequentes da via catabólica da tirosina. Assim, os metabolitos tóxicos resultantes da deficiência da FAH estão em quantidade bastante reduzida. Esta terapia é associada a uma dieta pobre em alimentos proteicos, com vista a reduzir a quantidade de tirosina presente no organismo. Inicialmente é administrada numa proporção 1-2 mg/kg dividida em três doses diárias, sendo ajustada de acordo com o perfil bioquímico do paciente.

O objetivo da terapêutica é diminuir a produção de metabolitos tóxicos que prejudicam a função hepática, fazendo com que esta melhore nos doentes diagnosticados com tirosinemia tipo I.

Os testes de monitorização para avaliar a eficácia da terapêutica são efetuados pela medição de SA excretada na urina, ou pela medição de tirosina e SA em amostras de sangue (Sander *et alii*, 2011; Herebian *et alii*, 2009).

### **4.3 Tirosinemia tipo II**

A tirosinemia tipo II ou síndrome de Richner-Hanhart é um EIM originado pela deficiência na enzima hepática citosólica tirosina aminotransferase (TAT), enzima participante no metabolismo da tirosina (Tsai *et alii*, 2006). É uma doença autossómica recessiva que resulta numa mutação ao nível do gene TAT, que codifica a enzima com atividade reduzida ou inexistente. A principal consequência é a acumulação de tirosina no organismo (Legarda *et alii*, 2011).

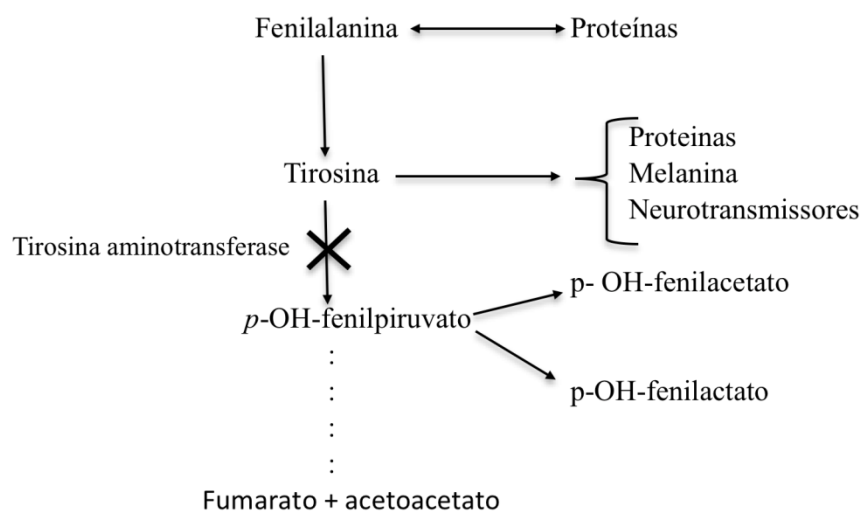
Entre os tipos de tirosinemia (I, II e III), o tipo II é o que origina maior concentração tóxica de tirosina, sendo que os níveis característicos desta desordem variam entre 370 e

3420  $\mu\text{M}$ , elevadíssimos quando comparados com os níveis normais ( $<90 \mu\text{M}$ ). Além dos níveis elevados de tirosina, os seus metabolitos são também acumulados, nomeadamente, o ácido 4-hidroxifenilpiruvico, o ácido 4-hidroxifenilático e o ácido 4-hidroxifenilacético (Sgaravatti *et alii*, 2008). É um EIM raro, sendo a sua incidência menor que 1:250000 (Bouyacoub *et alii*, 2013).

#### 4.3.1 Tirosina aminotransferase (TAT)

É uma enzima interveniente no metabolismo da tirosina, promovendo o processo cetogénico e gluconeogénico, quando não há glucose disponível no sangue e o organismo necessita de energia. No metabolismo, esta é responsável pela reação de transaminação da tirosina que é convertida 4-hidroxifenilpiruvato com a transformação do  $\alpha$ -cetoglutarato a glutamato, como ilustra a figura 8 (Peragón *et alii*, 2009; Peragón, Higuera e Lupiáñez, 2010).

A enzima é codificada pelo gene TAT que se situa no cromossoma 16q22, codificando este gene enzimas de 454 aminoácidos (Macasai *et alii*, 2001).



**Figura 8. Interrupção da via metabólica da tirosina associada à desordem tipo II (adaptado de Scott, 2006).**

#### 4.3.2 Aspectos clínicos

Esta desordem afeta essencialmente os olhos, a pele e o sistema nervoso central (Sgaravatti *et alii*, 2008). Os sintomas associados à pele e aos olhos devem-se à acumulação de partículas de cristais de tirosina que resultam na formação de um processo inflamatório (Macasai *et alii*, 2001).

A nível ocular verifica-se epífora, fotofobia ou blefaroespasmos. Aspecto opaco da córnea, presença de lesões pseudodendríticas bilaterais, úlceras dendríticas, placas corneais ou conjuntivais são sinais relevantes indicativos da patologia. Os sintomas podem ser remissivos e podem ocorrer recidivas. Estes sintomas podem ser independentes das outras manifestações clínicas (sistema nervoso ou pele), por isso muitas vezes os pacientes são tratados para as queratites provocadas pelo vírus de herpes *simplex*, mas como as terapias não são eficazes no tratamento das lesões bilaterais, surge então a possibilidade dum caso de tirosinemia tipo II (Macasai *et alii*, 2001).

As manifestações a nível cutâneo ocorrem após o primeiro ano de vida, mas também se podem iniciar no primeiro mês, consistindo em dor progressiva, sem prurido, e placas hiperqueratósicas nas palmas das mãos e dos pés e muitas vezes associadas a hiperidrose (Charfeddine *et alii*, 2006).

A nível do sistema nervoso central, as manifestações variam, incluindo atraso mental, microcefalia com diminuição da inteligência, nistagmos, tremores, ataxia, deficiência a nível da fala, convulsões, entre outros. A nível neurotológico, ocorrem astrocitomas e problemas na mielinização. A evolução dos sintomas a nível do sistema nervoso central, pode ocorrer devido ao facto de não ter havido um tratamento precoce do distúrbio (Sgaravatti *et alii*, 2008; Čulic *et alii*, 2011).

### 4.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico baseia-se na presença dos sintomas e na medição dos parâmetros bioquímicos, nomeadamente, os níveis altos de tirosina no plasma e ácidos fenólicos na urina e também numa análise genómica (Legarda *et alii*, 2011).

A tirosinemia tipo II pode ser detetada no programa de triagem neonatal, no entanto, o teste não é muito frequente porque a doença é rara, mas caso não seja diagnosticada pode acarretar consequências graves (Tsai *et alii*, 2006).

Os pacientes podem apresentar sintomas a nível oftálmico, cabendo ao oftalmologista analisar a probabilidade da presença de tirosinemia tipo II e aconselhar um diagnóstico o mais rápido possível (Macasai *et alii*, 2001).

É difícil para os oftalmologistas e dermatologistas confirmar de imediato uma tirosinemia tipo II, porque as lesões podem indicar variadas patologias. Por exemplo, as lesões a nível oftálmico podem indicar queratites virais, tal como referido anteriormente. Além disso, o diagnóstico da tirosinemia não é definitivo até ao aparecimento de lesões a nível cutâneo.

De um modo geral, o diagnóstico para a tirosinemia tipo II baseia-se em elevados níveis de tirosina no sangue e elevados níveis de ácido 4-hidroxifenólico na urina, sendo também muito importante ter em conta os níveis dos metabolitos da tirosina. Para o auxílio do diagnóstico é igualmente importante a análise molecular do genoma para detetar a mutação a nível do gene TAT. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um dos métodos que pode ser utilizado para análise molecular (Bouyacoub *et alii*, 2013).

Um diagnóstico positivo para a tirosinemia tipo II é caracterizado por níveis normais doutros aminoácidos, como a metionina e a fenilalanina. Há uma maior excreção na urina de *p*-hidroxifenilpiruvato, *p*-hidroxifenilactato e *p*-hidroxifenilacetato, assim como de pequenas quantidades de N-acetiltirosina e 4-tiramina (Scott, 2006).

#### 4.3.4 Tratamento

O melhor tratamento começa com uma detecção precoce da doença. Geralmente compreende uma dieta restrita em proteínas, nomeadamente tirosina e fenilalanina, em associação com suplementos formulados com aminoácidos. Com este procedimento há uma regressão considerável dos sintomas associados à desordem, tanto a nível oftálmico, como cutâneo e ao nível do sistema nervoso central. Com a dieta e a suplementação com fórmulas de aminoácidos, os níveis de tirosina no plasma baixam para valores inferiores a 600  $\mu\text{M}$  (Čulic *et alii*, 2011; Scott, 2006).

A administração oral de retinóides melhora os problemas cutâneos, mas esta terapia não interfere na descida dos níveis de tirosina no plasma. A administração de treonina melhora as lesões a nível ocular (Macasai *et alii*, 2001).

#### 4.4. Deficiência na metionina adenosiltransferase

A hipermetioninemia é um erro inato do metabolismo caracterizado pela deficiência na enzima metionina adenosiltransferase (MAT). A doença foi descoberta em 1974 (Couce *et alii*, 2013). A hipermetioninemia é estabelecida quando os níveis de metionina de plasma se encontram em valores considerados anormais, entre 48 e 56  $\mu\text{mol/L}$ . Muitas vezes, o distúrbio é descoberto quando se faz o diagnóstico para a homocistinúria (Hirabayashi *et alii*, 2013).

Existem três formas de distúrbio: deficiência na MAT-I, MAT-II e MAT III. MAT I e III são codificadas pelo mesmo gene MATIA, correspondendo às formas tetraméricas e diméricas duma única subunidade  $\alpha 1$ , respetivamente. Este gene é expresso apenas em células hepáticas maduras. O MAT2A, gene que codifica a forma MAT II, é expresso em todos os tecidos.

A hipermetioninemia pode dever-se a fatores genéticos, a nível de mutações ocorridas no genes ou de fatores não genéticos, tais como doença hepática, dieta abundante em metionina, baixo peso à nascença ou prematuridade (Furujo *et alii*, 2012).

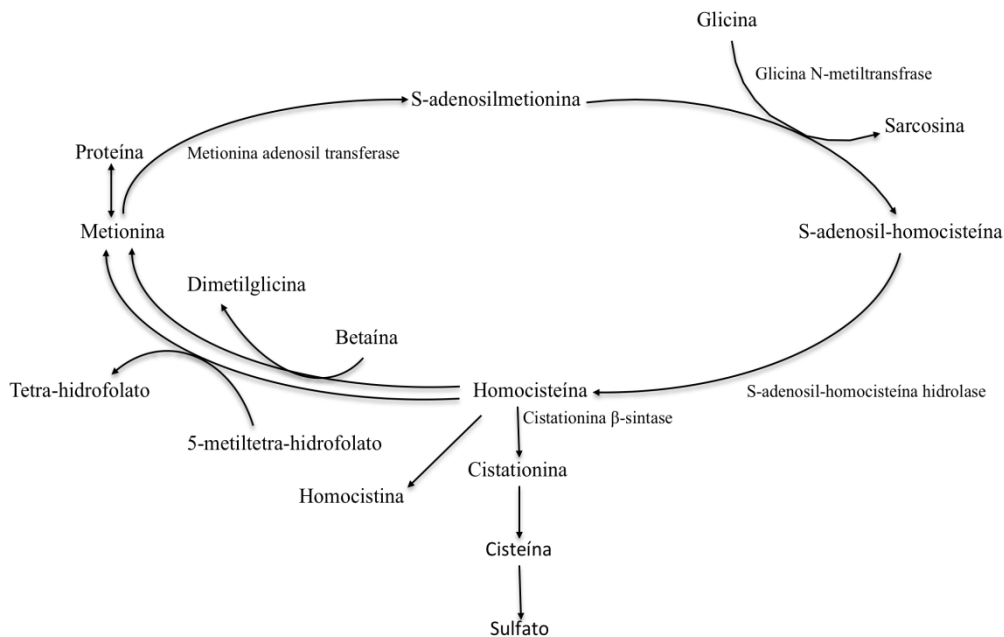
#### 4.4.1 Via metabólica envolvida

O metabolismo da metionina e da homocisteína, representado na figura 9, co-ativa a transferência do grupo metilo da seguinte forma: inicia com a entrada de um grupo contendo um carbono central derivado da oxidação da serina; este carbono liga-se ao tetra-hidrofolato sendo reduzido a 5,10-metilenotetra-hidrofolato e depois a 5-metiltetra-hidrofolato. Este último transfere o seu grupo metilo para a homocisteína formando a metionina. O último passo para a formação da metionina requer a enzima metionina sintase, dependente da cobalamina. A oxidação da betaína pela enzima betaína-homocisteína metiltransferase origina o segundo grupo metilo. Seguidamente, a metionina é ativada a S-adenosilmetionina, reação catalisada pelas MAT I/III. Através da transmetilação é formada a adenosil-homocisteína, a qual é de seguida quebrada, regenerando a homocisteína, que volta a entrar no ciclo. A homocisteína é condensada com a serina para formar a cistationina, reação catalisada pela cistationina  $\beta$ -sintase e dependente de piridoxal fosfato.

O metabolismo alternativo ocorre quando as concentrações da metionina no plasma atingem 300  $\mu\text{M}$ , resultando numa reação de transaminação que forma 4-metiltio-3-oxobutirato e sulfito de dimetilo (Furujo *et alii*, 2012).

#### 4.4.2 Metionina adenosiltransferase

A MAT é uma enzima que catalisa um passo importante na via metabólica da metionina. Está envolvida na transferência do grupo adenosilo do ATP para a metionina para formar S-adenosilmetionina (SAM) e tripolifosfato, sendo seguidamente hidrolisado (Chamberlin *et alii*, 2000).



**Figura 9. Metabolismo da metionina, S-adenosilmetionina, homocisteína, cistationina e compostos relacionados (retirado de Hirabayashi *et alii*, 2013).**

#### 4.4.3 S-adenosilmetionina

A S-adenosilmetionina (SAM) é uma molécula distribuída nos tecidos e fluidos biológicos do organismo. É sintetizada naturalmente pelo organismo durante o metabolismo da metionina a cisteína, taurina, glutatona e outros compostos poliamina na presença da metionina adenosiltransferase e ATP. A atividade enzimática ocorre maioritariamente no fígado, que utiliza mais de 70 % da metionina da dieta, apesar da síntese da S-adenosilmetionina ocorrer em todas as células. Esta síntese está ligada ao

metabolismo do folato e da cobalamina, sendo a principal função da SAM doar o grupo metilo a várias moléculas, tais como catecolaminas, fosfolípidos membranares, ácidos gordos, ácidos nucleicos, porfirinas, carnitina, colina e creatinina (Strous *et alii*, 2009).

#### **4.4.4 Aspectos clínicos**

Na maior parte dos casos, não existem sintomas clínicos associados à doença, podendo considerar que esta é relativamente benigna. Contudo, para casos sintomáticos ocorrem problemas a nível do sistema nervoso central, como a sua desmielinização e outros problemas a nível neurológico. Estes sintomas são detetados no início da infância ou posteriormente. A respiração, o suor e a urina podem ter o odor modificado devido ao metabolismo alternativo da metionina que se inicia em concentrações superiores a 300-350  $\mu\text{M}$  no plasma, formando sulfito de dimetilo. Nos casos severos da doença, a homocisteína está também a níveis elevados. Em estudos já efetuados foram detetados, para além de problemas neurológicos associados à desmielinização do sistema nervoso central e deficiência intelectual, danos hepáticos (Furujo *et alii*, 2012; Hirabayashi *et alii*, 2013; Couce *et alii*, 2013).

#### **4.4.5 Diagnóstico**

O diagnóstico é feito nos primeiros dias de vida (Couce *et alii*, 2013). Começa pela deteção de níveis altos de metionina no plasma, que pode ser feita espetrometria de massa *tandem*. Um diagnóstico sugestivo de deficiência em MAT I/III apresenta níveis altos de metionina no plasma e não muito altos de homocisteína (Furujo *et alii*, 2012).

Níveis altos de metionina podem ser sugestivos de mais do que uma patologia, como já referido anteriormente. Para se excluïrem outras causas de hipermetioninemia as

condições genéticas a testar são homocistinúria, devido à deficiência na enzima cistationina-β-sintase, deficiência na enzima glicina-N-metiltransferase, deficiência na enzima S-adenosil-homocisteína hidrolase, deficiência em citrulina e deficiência na enzima fumarilacetoacetato hidrolase. Os métodos cromatográficos são ótimos para detectar metionina e seus aminoácidos. Um caso severo de deficiência de MAT apresenta para além de níveis elevados de metionina, níveis elevados de homocisteína, com valores acima dos 59 μM, logo pode ser confundido com um diagnóstico de homocistinúria, sendo necessário analisar cuidadosamente os resultados.

Uma ressonância magnética ao cérebro avalia o grau de severidade da desmielinização e também a resposta ao tratamento nos casos em que existe sintomatologia associada (Furujo *et alii*, 2012).

#### **4.4.6 Tratamento**

Quando é efetuado o diagnóstico no recém-nascido e é detetado o EIM, mas está presente numa forma assintomática, não há necessidade da aplicação de tratamento, sendo, no entanto, necessário supervisionar constantemente os níveis de metionina e intervir sempre que necessário. No caso de formas severas da doença com sintomas a nível neurológico devido à deficiência na MAT, é necessário implementar tratamento, tendo como hipóteses a administração de S-adenosilmetionina dissulfato tosilato numa dose de 400 a 800 mg duas vezes ao dia, restaurando uma mielinização normal (Furujo *et alii*, 2012).

Desde que os problemas neurotóxicos se verifiquem apenas com o aumento da concentração de metionina, uma dieta restrita neste aminoácido pode também ser uma estratégia para a terapêutica. No entanto, visto que não há ingestão de metionina, também não ocorre síntese de SAM, o que pode prejudicar outros processos

metabólicos. Além disso, há casos com uma evolução favorável dos sintomas sem recurso à restrição dietética (Furujo *et alii*, 2012).

#### **4.4.6.1 Suplementação com S-adenosilmetionina (SAM)**

Como visto anteriormente, a suplementação com SAM melhora os sintomas associados à desordem, nomeadamente a desmielinização a nível do sistema nervoso central. No entanto, este composto na forma exógena revela-se relativamente instável, sendo portanto necessário corrigir esta desvantagem. Para tal, foram desenvolvidas formulações com vista a estabilizar o composto. Estas contêm sais estáveis de S-adenosilmetionina, como tisolato e dissulfato (STD) ou 1,4-butanodissulfonato (Yang *et alii*, 2009).

### **4.5 Homocistinúria**

A homocistinúria (HCU) , é um erro inato de metabolismo, descoberto por Field *et alii* em 1962 com uma incidência de 1 caso a cada 300000 nascimentos, aproximadamente (Yung-Hsiu *et alii*, 2012). É uma doença autossómica recessiva, existindo três tipos, de acordo com a deficiência da enzima.

- Tipo I- Deficiência na cistationina  $\beta$ -sintase (CBS) e do cofactor piridoxina (Vitamina B<sub>6</sub>);
- Tipo II- Deficiência da enzima tetra-hidrofolato metiltransferase;
- Tipo III- Deficiência na enzima tetra-hidrofolato redutase (Yamada *et alii*, 2005).

O tipo mais comum da doença é o I, que causa acumulação de concentrações tóxicas de homocisteína, que é excretada na urina, e homocisteína total (homocisteína e seus derivados dissulfito) e de L-metionina no sangue (Yamasaki-Yashiki, Tachibana e Asano, 2012).

A elevação das concentrações de homocisteína são normalmente acompanhadas pelo aumento das concentrações de metionina (Skovby *et alii*, 2010)

#### **4.5.1 Homocisteína (Hcy)**

A homocisteína é um aminoácido não essencial produzido a partir da desmetilação da metionina. A Hcy pode voltar a ser metilada a metionina, reação catalisada pela enzima metionina sintase e o cofator vitamina B12, sendo o 5-metiltetra-hidrofolato o dador do grupo metilo. A Hcy pode também ser convertida em cisteína, reação catalisada pelas enzimas cistationina  $\beta$ -sintase e cistationinase, necessitando estas do cofator vitamina B6. Outra forma de remover a Hcy é convertê-la em S-adenosil-homocisteína (SAH), sendo esta reação catalisada pela enzima SAH-hidrolase e favorecida com o aumento da formação de SAH se houver aumento das concentrações de Hcy, como se pode verificar na figura 10 (Obeid e Herrmann, 2009).

A concentração de homocisteína no plasma normalmente varia entre 5 e 15  $\mu M$ . Concentrações superiores são consideradas anormais, levando a suspeitar de deficiências nas enzimas intervenientes no processo metabólico da homocisteína ou nos cofatores (vitaminas B<sub>6</sub> e B12 e folatos). Algumas doenças, como por exemplo, falha renal crónica, anemia, hipotiroidismo, diabetes, entre outras, também podem ser causa de elevadas concentrações de homocisteína no plasma, assim como alguma medicação (fenitoína, carbamazepina), fatores fisiológicos (idade ou sexo) ou estilo de vida (fumo,

álcool, café). O distúrbio é considerado moderado se as concentrações estiverem entre 15 e 30  $\mu\text{M}$ , intermédio entre 30 e 100  $\mu\text{M}$  e grave se  $>100 \mu\text{M}$  (Ducros *et alii*, 2002).

#### 4.5.2 Cistationina $\beta$ -sintase

É uma enzima dependente de piridoxal fosfato que intervém na transulfuração, processo que consiste na condensação da homocisteína e serina para originar a cistationina, que é convertida posteriormente em cisteína pela enzima cistationina  $\gamma$ -liase. No entanto, quando ocorrem mutações no gene que codifica esta enzima, ela torna-se deficiente não ocorrendo o processo de transulfuração (Casique *et alii*, 2013; Maclean *et alii*, 2012).

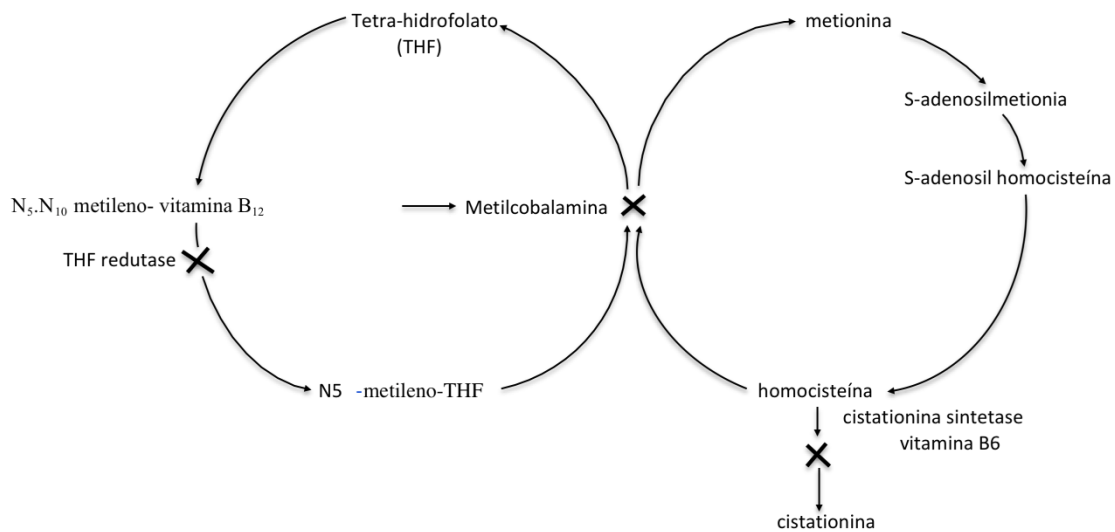


Figura 10. Via metabólica da homocisteína (retirado de Yamada *et alii*, 2005).

#### 4.5.3 Aspetos clínicos

São vários os sintomas associados à doença, atingindo principalmente o olho, o esqueleto, o sistema vascular e o sistema nervoso central. A nível oftálmico, as

principais patologias envolvidas são a miopia grave e a ectopia do cristalino. Além destas, podem ocorrer osteoporose, esclerose ou hábito marfanóide, podendo a doença também levar a arterioesclerose prematura, tromboembolismo, atraso mental, convulsões e distúrbios psiquiátricos (Yung-Hsiu *et alii*, 2012).

Os sintomas associados ao sistema nervoso central são característicos da HCU tipo III, ou seja, à deficiência na enzima tetra-hidrofolato redutase, devido a altas concentrações de metionina e de homocisteína ( Yamada *et alii*, 2005).

#### **4.5.4 Diagnóstico**

O diagnóstico do programa de triagem neonatal é efetuado através da medição dos níveis de homocisteína ou metionina (L-Met) no sangue. Vários métodos de detecção foram já utilizados, tais como imunoenaios, cromatografia líquida de alta resolução, espectrofotometria de massa *tandem*, ensaio enzimático em microplacas (Yamasaki-Yashiki, Tashibano e Asano, 2012).

Os níveis de L-Met podem ser determinados diretamente, sem precisar de derivatização. No entanto, no caso da Hcy é necessário um processo mais complexo, que pode incluir redução química, derivatização e desproteínização, uma vez que a homocisteína existe em diferentes formas (livre, dissulfídica ou ligada a proteínas). O método enzimático em microplacas tem sido o mais usado, visto ser simples e barato, carecendo no entanto de precisão. A HPLC é um bom método para o diagnóstico da HCU, todavia terá de ser associado a uma derivatização para melhor seletividade e sensibilidade. A espectrofotometria de massa *tandem* é o melhor método, visto ser o mais rentável, mas acarreta elevados custos na quantificação de L-Met. Como os valores de metionina e galactose são elevados em recém-nascidos com galactosemia, esta pode ser confundida com a HCU, se se utilizar a L-Met como marcador, sendo por isso necessário

desenvolver um método de diagnóstico específico para homocistinúria (Lee *et alii*, 2012).

#### **4.5.5 Tratamento**

O tratamento geral da homocistinúria consiste numa dieta restrita em metionina e em suplementação com vitamina B6 (piridoxina). No caso de doentes que não respondem à terapia com B6, a administração de betaína é uma solução (Casique *et alii*, 2013).

A betaína funciona como um doador do grupo metilo na reação de metilação da homocisteína a metionina, reação essa que ocorre quase exclusivamente no fígado e que é catalisada pela betaína e homocisteína S-metiltransferase.

O tratamento utilizado costuma ser eficaz, apresentado, no entanto, algumas desvantagens. A dieta restrita em metionina é difícil de ser mantida, especialmente nos indivíduos que já tinham experimentado uma alimentação normal e a quem só depois foi diagnosticada a doença. Com o uso de betaína, foram já registados casos de edema cerebral. Devido à relativa raridade deste EIM, os custos associados à manipulação da betaína são elevados. De modo a reduzir a restrição dietética de betaína e os seus custos elevados, uma nova formulação está a ser estudada (Maclean *et alii*, 2012).

#### **4.6 Doença da urina de xarope de bordo**

A doença da urina de xarope de bordo (MSUD) ou leucinose é uma doença autossómica hereditária originada pelo defeito na atividade de um complexo enzimático, o  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (BCKD). Este facto tem como consequência a acumulação de aminoácidos de cadeia ramificado como a leucina (leu), a isoleucina (ile) e a valina (val) e os correspondentes  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada

nas células e fluidos biológicos, levando a neurotoxicidade e doença progressiva neurodegenerativa (Yang *et alii*, 2012).

Em 1954, Menkes, Hurst e Graig detetaram cetoacidose com progressiva deterioração neurológica e um odor suspeito (semelhante a xarope de açúcar) em quatro pacientes recém-nascidos. Estima-se que a incidência mundial da doença é superior a 1:185000 recém-nascido (Puckett *et alii*, 2010; Quental *et alii*, 2010).

A doença pode ser dividida em quatro formas dependendo do nível de atividade do complexo enzimático BCKD. A forma clássica caracteriza-se por ter menos de 2% da atividade enzimática normal, a intermediária tem entre 3% a 8%, a forma intermitente com atividade enzimática entre 8% e 15% do normal e, por fim, a forma associada ao tratamento com tiamina (administrando elevadas doses de tiamina, a atividade enzimática atinge níveis perto da normalidade, atenuando assim os sintomas associados à doença).

A forma clássica é a mais severa, manifestando-se logo nas primeiras semana de vida através de crises metabólicas, podendo levar à morte, caso não seja tratada. A maioria dos pacientes padece desta forma (Sener, 2007; Puckett *et alii*, 2010; Quental *et alii*, 2010; Yang *et alii*, 2012).

#### **4.6.1 Aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) - leucina, isoleucina e valina**

Os aminoácidos de cadeia ramificada, nomeadamente, leucina, isoleucina e valina desempenham variadas funções no organismo. São componentes das proteínas, muito importantes na função celular, exercendo a leucina a maior influência. Esta regula a síntese de proteínas no músculo esquelético e no tecido adiposo, além do catabolismo deste aminoácido nas células  $\beta$ -pancreáticas estimular a libertação de insulina, o que origina o aumento da glucose no sangue. Os BCAA atravessam a barreira

hematoencefálica mais facilmente que outros aminoácidos, sendo a principal fonte de azoto na formação do neurotransmissor glutamato no tecido cerebral. A sua concentração na célula é regulada através da dieta, autofagia das proteínas celulares e degradação. Para além disto, o catabolismo é controlado pela atividade do complexo  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, que se encontra na mitocôndria de todas as células (Nellis *et alii*, 2003).

#### **4.6.2 Complexo enzimático $\alpha$ -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (BCKD)**

A MSUD é predominantemente causada por mutações nos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT, que codificam, respetivamente, as subunidades E1, E2 e E3 do complexo BCKD. Este complexo enzimático é organizado à volta duma unidade cúbica com 24 subunidades de di-hidrolipoil transacilase (E2), que é completada por múltiplas cópias de  $\alpha$ -cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada (E1), di-hidroxiipoamida desidrogenase (E3), BCKD cinase e BCKD fosfatase. O componente E1 necessita do cofator tiamina pirofosfato. As mutações podem ocorrer em qualquer um dos genes que codificam as subunidades do complexo, originado assim os vários tipos de distúrbio: tipo Ia com origem na mutação da subunidade E1 $\alpha$ , tipo Ib relacionado com a subunidade E1 $\beta$ , tipo II com a subunidade E2 e tipo III com a subunidade E3. Esta última subunidade é também partilhada pelos complexos piruvato e  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase, o que implica que mutações no gene que codifica esta unidade, alteram a função de outras enzimas (Yang *et alii*, 2012).

#### 4.6.3 Via metabólica relativo ao distúrbio

Ocorrendo mutação ao nível do complexo enzimático, este perde a sua atividade. Tal vai fazer com que não haja oxidação dos ácidos  $\alpha$ -cetoisocapróico,  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalérico e  $\alpha$ -cetoisovalérico, levando à acumulação dos seus metabolitos, dos hidroxiderivados, tais como ácido  $\alpha$ -hidroxisocapróico (HIC),  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -metil-n-valérico (HNV) e ácido  $\alpha$ -hidroxisovalérico (HIV) e os seus precursores, que são respetivamente leucina, isoleucina e valina (Vasques, Brinco e Wajner, 2005).

#### 4.6.4 Aspetos clínicos

Com a acumulação dos metabolitos a níveis tóxicos, surgem várias complicações subsequentes. A forma clássica manifesta-se nos primeiros dias de vida, apresentando sintomas como falta de apetite, letargia, tom de pele anormal, convulsões e cetoacidose. Caso não se inicie um tratamento à base de destoxificação e/ou adaptação duma fórmula livre de BCAA, o paciente pode ficar com danos cerebrais irreversíveis.

As formas intermitente e intermediária apresentam outros sintomas. A intermediária caracteriza-se sobretudo por atraso no desenvolvimento, sendo os níveis elevados de BCAA persistentes. Na forma intermitente, o crescimento e desenvolvimento são normais, mas quando a doença se manifesta é sob a forma de ataxia e cetoacidose, sendo que as alterações bioquímicas se verificam apenas nestes episódios (Puckett *et alii*, 2010)

#### 4.6.5 Diagnóstico

O diagnóstico para este distúrbio baseia-se na medição dos níveis de leucina no plasma, constituindo níveis anormais quando os valores são maiores que 140  $\mu\text{M}$  (Nellis *et alii*, 2003). O primeiro método de diagnóstico foi o ensaio de inibição bacteriana para medição da leucina. Com a evolução da ciência, em 1995, foi estipulado o método de espectrometria de massa *tandem*, permitindo este detetar os níveis de leucina e valina a partir de amostras de sangue. Como já referido anteriormente, o método é sensível e específico, não permitindo, no entanto, diferenciar os aminoácidos isobáricos entre si e da hidroxiprolina.

O uso de espectrometria de massa no programa de triagem neonatal é bom para identificar doentes que sofrem da forma clássica da doença da urina de xarope de bordo, permitindo assim iniciar o tratamento o mais precocemente possível. Todavia, este método não deteta as outras formas da doença (Puckett *et alii*, 2010).

#### 4.6.6 Tratamento

Concentrações muito elevadas de BCAA e dos correspondentes  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKA) necessitam de medidas urgentes para baixar drasticamente os níveis de leucina no plasma, que consistem em transfusões de sangue repetidas, hemodiálise e hemofiltração. No entanto, estes métodos são perigosos e caros, além disso de necessitarem de maiores cuidados e da hospitalização do paciente (Heldt *et alii*, 2005).

Normalmente o tratamento base consiste numa dieta restrita, à semelhança do que se tem vindo a constatar para outras desordens. Neste caso, os aminoácidos a retirar da dieta são leucina, valina e isoleucina. No entanto, o problema geral da restrição dietética é não ser corretamente seguida, causando crises metabólicas e deterioração neurológica.

Por vezes, mesmo com a dieta adequada verificam-se casos de descompensação metabólica (Nellis *et alii*, 2003; Skvorak *et alii*, 2013).

Uma alternativa à dieta é o transplante de fígado ortotópico, sendo este contudo um método invasivo, caro e que requer imunossupressores. Além disso, os órgãos para transplante têm um tempo de vida mais curto e também é necessário o fígado ser compatível com o organismo em questão, pois caso contrário ocorrerá a rejeição do novo órgão. Em alternativa ao transplante ortotópico, há o transplante de hepatócitos, método que se revela mais barato e menos complicado (Skvorak *et alii*, 2013).

### III. CONCLUSÃO

O estudo do genoma permitiu a descoberta da origem de inúmeras doenças e características do ser humano, abrindo uma nova área de estudo. Graças a Garrod, Beadle e Tatum foi descoberto que a origem de muitas doenças provinha de mutações nos genes codificadores de enzimas, sendo estas designadas por erros inatos do metabolismo.

A suspeita dum erro inato de metabolismo começa quando há alterações do equilíbrio bioquímico duma criança, por vezes perfeitamente normal à nascença, evoluindo posteriormente o processo para uma análise minuciosa de confirmação. Os erros inatos de metabolismo têm associados sintomas e consequências graves, que incluem problemas a nível do sistema nervoso central, sistema respiratório, digestivo, entre outros. Estes sintomas podem surgir precocemente (dias após o nascimento) ou mais tardiamente (na infância). Assim que se detete um erro inato de metabolismo, é muito importante seguir um tratamento adequado, de modo a minimizar ou eliminar os sintomas (sempre que possível). Portanto torna-se crucial a sua rápida deteção e o início do tratamento com a maior brevidade possível.

Em Portugal, os erros inatos do metabolismo estão inseridos num programa de triagem neonatal, chamado vulgarmente “teste do pezinho”. Atualmente, a espectrometria de massa *tandem* é o método de análise mais utilizado, tanto em Portugal como noutros países, visto ser rápido, sensível, requerer pouca mão-de-obra, permitir detetar várias doenças simultaneamente e, além disso, produzir poucos falsos positivos.

Os erros inatos de metabolismo compreendem variadas vias, sendo que neste trabalho de dissertação foram abordados os distúrbios no metabolismo dos aminoácidos, nomeadamente as desordens mais frequentes em Portugal, concluindo-se que, à exceção da tirosinemia tipo II, são também os mais frequentes no mundo.

Relativamente às doenças abordadas, algumas envolvem uma via alternativa, levando à acumulação de metabolitos tóxicos e são classificadas como grave, moderada ou ligeira, de acordo com as concentrações de metabolitos tóxicos ou de acordo com a enzima deficiente na via metabólica de cada aminoácido, originando então os sintomas associados a cada uma. A consequência mais frequente entre estas doenças são os problemas a nível do sistema nervoso central, nomeadamente, o atraso no desenvolvimento.

Algumas doenças são detetadas pelo programa de triagem neonatal, no entanto, outras são mais específicas, necessitando da deteção de determinados metabolitos, o que exige um diagnóstico complementar.

O tratamento destas desordens assenta, geralmente, numa dieta restrita no aminoácido em cuja via metabólica há deficiência enzimática e numa suplementação de proteína. No entanto, a dieta restritiva tem efeitos secundários associados à falta de proteína. Contudo, existem alternativas, designadamente, terapia farmacológica, terapia de substituição enzimática, transplante, entre outros.

Tem-se verificado uma evolução constante e favorável em todos os aspetos, no que diz respeito aos erros inatos do metabolismo, nomeadamente a nível do esclarecimento do mecanismo patológico, da deteção atempada da desordem e do tratamento associado, o que tem vindo a permitir melhorar a qualidade de vida de todos aqueles que padecem de um erro inato de metabolismo.

#### IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Dirbashi, O. Y. *et alii.* (2006). Quantification of succinylacetone in urine of hepatorenal tyrosinemia patients by HPLC with fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta*, 365, pp. 243-248.

Al-Dirbashi, O. Y. *et alii.* (2010). Identification of a neonate with hepatorenal tyrosinemia by combined routine newborn screening for succinylacetone, acylcarnitines and amino acids, *Clinical Biochemistry*. 43, pp 691-693.

Aguado, C. *et alii.* (2007). BH4 responsiveness associated to a PKU mutation with decreased binding affinity for the cofactor. *Clinica Chimica Acta*, 380, pp. 8-12.

Alfadhel, M. *et alii.* (2013). Drug treatment of inborn errors of metabolism: a systematic review. *Arch Dis Child*, 98 (6), pp 454-461.

Allard, P. *et alii.* (2004). Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry: analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. *Clinical Biochemistry*, 37. (11). Pp. 1010-1015.

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

Barić, I., Fumić, K. e Hoffmann G.F. (2001). Inborn errors of metabolism at the turn of the Millennium. *Croatian Medical Journal*, 42 (4), pp. 379-383.

Blau, N. *et alii.* (2011). Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, pp. S2-S9.

Blau, N., Van Spronsen, F. J. e Levy. H. L. (2010) Phenylketonuria, *The Lancet*, 376, pp. 1417-1427.

Blau, N. *et alii.* (2009). Optimizing the use of sapropterin (BH4) in the management of phenylketonuria, *Molecular Genetics and Metabolism*, 96, pp. 158-163.

Bouyacoub, Y. *et alii.* (2013). Novel and recurrent mutations in the TAT gene in Tunisian families affected with Richner–Hanhart Syndrome. *Gene*, 529, pp. 45-49.

Bueno, M. A. *et alii.* (2012). New evidence for assessing tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness, *Metabolism Clinical and Experimental*, 61, pp. 1809-1816.

Campeau, P, M., Scriver C. R. e Mitchell, J.J. (2008). A 25-year longitudinal analysis of treatment efficacy in inborn errors of metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, 95, pp. 11-16.

Campbell, M. K. (2001). *Bioquímica*. Porto Alegre, Artmed. P. 96.

Campos, L. S. (1999). *Entender a bioquímica*, 2º edição. Lisboa, Escolar Editora.

Cansever, M. Ş e Erim, F.B. (2005). Determination of urinary succinylacetone by capillary electrophoresis for the diagnosis of tyrosinemia type I. *Journal of Chromatography B*, 818, pp. 309-311.

Casique, L. *et alii*. (2013). Characterization of two pathogenic mutations in cystathionine beta-synthase: Different intracellular locations for wild-type and mutant proteins. *Gene*, [Artigo em impressão].

Chamberlin, M. E. *et alii*. (2000). Methionine Adenosyltransferase I/III Deficiency: Novel Mutations and Clinical Variations. *The American Journal of Human Genetics*, 66, pp. 347-355.

Charfeddine, C. *et alii*. (2006). Clinical and mutational investigations of tyrosinemia type II in Northern Tunisia: Identification and structural characterization of two novel TAT mutations. *Molecular Genetics and Metabolism*, 88, pp. 184-191.

Chunli, Y. e Ronald, S.C. (2006). Human biochemical genetics: an insight into inborn errors of metabolism. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7 (2), pp 165-166.

Constantinou, M.A. *et alii*. (2004). Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with principal component analysis in detecting inborn errors of metabolism using blood spots: a metabolomic approach, *Analytica Chimica Acta*, 51, pp.303–312.

Couce, M. L. *et alii*. (2013). Clinical and metabolic findings in patients with methionine adenosyltransferase I/III deficiency detected by newborn screening. *Molecular Genetics and Metabolism*. [Artigo em impressão].

Couce, M. L. *et alii.* (2011). Evaluation and long-term follow-up of infants with inborn errors of metabolism identified in an expanded screening programme. *Molecular Genetics and Metabolism*, 140(4), pp 470-475.

Čulic, V. *et alii.* (2011). Tyrosinemia type II (Richner-Hanhart syndrome): A new mutation in the TAT gene. *European Journal of Medical Genetics*, 54, pp. 205-208.

Demers S. I. *et alii.* (2003). Frequent Mutation Reversion Inversely Correlates With Clinical Severity in a Genetic Liver Disease, Hereditary Tyrosinemia. *Human Pathology*, 34 (12), pp. 1313-1320.

Devlin, T.M. (1997). *Textbook Of Biochemistry With Clinical Correlations*. 4º edição New York, Wiley-Lis.

Dhillon, K. S. *et alii.* (2011). Improved tandem mass spectrometry (MS/MS) derivatized method for the detection of tyrosinemia type I, amino acids and acylcarnitine disorders using a single extraction process. *Clinica Chimica Acta*, 412, pp. 873-879.

Ducros, V. *et alii.* (2002). Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results. *Journal of Chromatography B*, 781, pp. 207-226.

El Husny, A. S. e Fernandes-Caldato, M . C. (2006). Erros inatos do metabolismo: revisão de literatura. *Revista Paraense de Medicina*, 20(2), pp. 41-45.

Feillet, F. *et alii.* (2008). Evaluation of neonatal BH4 loading test in neonates screened for hyperphenylalaninemia, *Early Human Development*, 84, pp. 561-567.

Furujo, M. *et alii.* (2012). Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: Neurological manifestations and relevance of S-adenosylmethionine. *Molecular Genetics and Metabolism*, 107, pp. 253-256.

Forujo, M. *et alii.* (2012). S-adenosylmethionine treatment in methionine adenosyltransferase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 105 (3), pp. 516-518

Gaw, A. *et alii.* (2004). *Clinical Biochemistry*. 3<sup>o</sup> edição. London, Churchill Livingstone.

Halpern, M. J. (1997). *Bioquímica*. Lisboa, Lidel.

Heldt, K. *et alii.* (2005). Diagnosis of MSUD by newborn screening allows early intervention without extraneous detoxification. *Molecular Genetics and Metabolism*, 84, pp. 313-316

Herebian, D. *et alii.* (2009). Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantitation of NTBC (2-(nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)1,3-cyclohexanedione) in plasma of tyrosinemia type I patients. *Journal of Chromatography B*, 877, pp. 1453-1459.

Hirabayashi, k. *et alii.* (2013). Neurologically normal development of a patient with severe methionine adenosyltransferase I/III deficiency after continuing dietary methionine restriction, *Gene*. [Artigo em impressão].

Imtiaz, F. *et alii*. (2011). Identification of mutations causing hereditary tyrosinemia type I in patients of Middle Eastern origin. *Molecular genetics and Metabolism*, 104, pp. 688-690.

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

Jorde, *et alii*. (2004). *Genética Médica*, 3ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier.

Kure S *et alii*. (1999). Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *The journal of Pediatrics*, 135(3), pp. 375–378.

Lee, J. Y. *et alii*. (2012). Methionine/galactose ratio on newborn blood spots useful for reduction of false positives for homocystinuria and galactosemia by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Clinica Chimica Acta*, 413, pp. 182-186.

Legarda, M. *et alii*. (2011). A large TAT deletion in tyrosinaemia type II patient. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, pp. 407-409.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L. e Cox, M. M. (1995). *Princípios da Bioquímica*, São Paulo, Sarvier.

Leonard, J. V. e Dezateux, C. (2010). Newborn screening for inborn errors of metabolism: principles, policies and weighing the evidence. *Paediatrics and Child Health*, 21 (2), pp. 56-60.

Lücke, T. *et alii.* (2003). BH4-Sensitive Hyperphenylalaninemia: New Case and Review of Literature. *Pediatric Neurology*, 28 (3), pp. 228-230.

Maclean *et alii.* (2012). Long-term betaine therapy in a murine model of cystathionine beta-synthase deficient homocystinuria: Decreased efficacy over time reveals a significant threshold effect between elevated homocysteine and thrombotic risk. *Molecular Genetics and Metablism*, 105, pp. 395-403.

Macasai, S. M. *et alii.* (2001). Tyrosinemia Type II: Nine Cases of Ocular Signs and Symptoms. *American Journal of Ophthalmology*, 123 (4), pp. 522-527.

Mak, C. M. *et alii.* (2013). Biochemical and molecular diagnosis of tyrosemia type I with two novel FAH mutations in a Hong Kong chinese patient: Recommendation for expanded newborn screening in Hong Kong. *Clinical Biochemistry*, 46, pp. 155-159.

Marín-Valencia, I. *et alii.* (2010). Assesment of the perimortem protocolo in neonates for the diagnosis of inborn errors of metabolism. *Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 14 (2), pp. 125-130.

Mckee, T. e Mckee, J. R. (2003). *Bioquímica - La Base Molecular de La Vida*, Madrid, Mcgraw-Hill.

Metz, T. F. *et alii.* (2012). Evaluation of a novel, commercially available mass spectrometry kit for newborn screening including succinylacetone without hydrazine. *Clinica Chimica Acta*, 413, pp. 1259-1264.

Nellis, M. M. *et alii.* (2003). Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression. *Molecular Genetics and Metabolism*, 80, pp.189-195.

Niu, D. M. (2011). Disorders of BH<sub>4</sub> metabolism and the treatment of patients with 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase deficiency in Taiwan. *Brain & development*, 33, pp. 847-855.

Obeid, R. e Herrmann, W. (2009). Homocysteine and lipids: S-Adenosyl methionine as a key intermediate. *FEBS Letters*, 583, pp. 1215-1225.

Peragón, J. *et alii.* (2009). Regulation of the kinetic behavior of serine dehydratase and tyrosine aminotransferase during the development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 293, pp. 119-124.

Peragón, J., Higuera, M. e Lupiáñez, J. A. (2010). Dietary protein differentially regulates the kinetic behaviour of serine dehydratase and tyrosine aminotransferase of liver and white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 157, pp. 213-219.

Pérez-Dueñas, B. *et alii.* (2004). Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. *Clinical Biochemistry*, 37, pp. 1083-1090.

Puckett, R. L. *et alii*. (2010). Maple syrup urine disease: Further evidence that newborn screening may fail to identify variant forms. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100, pp. 136-142.

Quental, S. *et alii*. (2010). Incidence of maple syrup urine disease in Portugal. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100, pp. 385-387.

Quintas, A. Freire, A.P. e Halpern, M.J. (2008). *Bioquímica Organização Molecular Da Vida*. Lisboa, Lidel.

Rao, A. N. *et alii*, (2009). Inborn Errors of Metabolism: Review and Data from a tertiary care center. *Indian Journal of clinical biochemistry*. 24 (3), pp. 215-222.

Rashed, M. S. *et alii*. (2005). Tandem mass spectrometric assay succinylacetone in urine for the diagnosis of hepatorenal tyrosinemia. *Analytical Biochemistry*, 339, pp.310-317.

Regaleiro, F. (2007). *Manual de Genética Médica*. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra.

Rivera, I. *et alii*. (2011). Phenylalanine hydroxylase deficiency: Molecular epidemiology and predictable BH4-responsiveness in South Portugal PKU patients. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, pp. S86-S92.

Rudnick, D. A. e Ebash, D. R. (2004). *Tyrosinemia*. USA, Elsevier

Sander, J. *et alii.* (2011). Monitoring tyrosinemia type I: Blood spot test for nitisinone (NTBC). *Clinica Chimica Acta*, 412, pp. 134-138.

Scott, C. R. (2006). The Genetic Tyrosinemias, *American Journal of medical Genetics Part C*, 142, pp. 121-126.

Sener, R. N. (2007). Maple syrup urine disease: Diffusion MRI, and proton MR spectroscopy findings. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 31, pp. 106-110.

Sgaravatti, A. M. *et alii.* (2008). Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26, pp. 551-559.

Skovby, F., Gaustadnes, M. e Mudd, S. H. (2010). A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99, pp. 1-3.

Skvorak, K. J. *et alii.* (2013). Improved Amino Acid, Bioenergetic Metabolite and Neurotransmitter Profiles following Human Amnion Epithelial Cell Transplant in Intermediate Maple Syrup Urine Disease Mice. *Molecular Genetics and Metabolism*, 109, pp. 132-138.

Spaapen, L. J. M. e Rubio-Gozalbo, M.E. (2003). Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, state of the art. *Molecular Genetics and Metabolism*, 78(2), pp. 93-99.

Stacy, L. W. *et alii*. (2012). Inborn errors of metabolism: Psychosocial challenges and proposed family systems model of intervention. *Molecular Genetics and Metabolism*, 10, pp. 537-541.

Strous, R. D. *et alii*. (2009). Improvement of aggressive behavior and quality of life impairment following S-Adenosyl-Methionine (SAM-e) augmentation in schizophrenia, *European Neuropsychopharmacology*, 19, pp. 14-22.

Stryer, L. (1995). *Bioquímica*. 4ª edição. Nova Iorque, W. H. Freeman and Company.

Trunzo, R. *et alii* (2013). Mutation analysis in hyperphenylalaninemia patients from South Italy, *Clinical Biochemistry*. [Artigo em impressão].

Tsai, C. P. *et alii*. (2006). Corneal Lesion as the Initial Manifestation of Tyrosinemia Type II. *Journal of the Chinese Medical Association*, 69(6), pp. 286-288.

Vasques, V. C., Brinco, F. e Wajner, M. (2005). Intrahippocampal administration of the branched-chain  $\alpha$ -hydroxy acids accumulating in maple syrup urine disease compromises rat performance in aversive and non-aversive behavioral tasks. *Journal of the Neurological Sciences*, 232, pp.11–21.

Vilarinho, *et alii*. (2010). Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *Journal of Metabolic Disease*, 33, pp 133-138.

Voet, D., Voet, J. G. e Pratt, C. W. (2006). *Fundamentals of Biochemistry*, John Wiley & Sons.

Yamada, T. *et alii.* (2005). General anesthesia for patient with type III homocystinuria (tetrahydrofolate e reductase deficiency ). *Journal of Clinical Anesthesia*, 17, pp. 565-567.

Yamasaki-Yashiki S., Tachibana, S. e Asano, Y. (2012). Determination of L-methionine using methionine-specific dehydrogenase for diagnosis of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ - synthase deficiency. *Analytical Biochemistry*, 428, pp. 143-149.

Yang, J. *et alii.* (2009). Pharmacokinetic Properties of S-Adenosylmethionine After Oral and Intravenous Administration of Its Tosylate Disulfate Salt: A Multiple-Dose, Open-Label, Parallel-Group Study in Healthy Chinese Volunteers. *Clinical Therapeutics*, 31 (2), pp. 311-320.

Yang, N. *et alii.* (2012). Analysis on gene mutations in Chinese patients with maple syrup urine disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 106, pp. 412-418.

Yung-Hsiu, H. Y. *et alii.* (2012). Homocystinuria in Taiwan: An inordinately high prevalence in an Austronesian aboriginal tribe, Tao. *Molecular Genetics and Metabolism*, 105, pp. 590-595.

Zimmermann, M. *et alii.* (2012). Positive effect of a simplified diet on blood phenylalanine control in different phenylketonuria variants, characterized by newborn BH4 loading test and PAH analyses. *Molecular Genetics and Metabolism*, 106, pp. 264-268.

Zyktovicz, T.H. *et alii.* (2013). Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia-I by tandem mass spectrometry using pooled samples: A four-year summary by the New England newborn screening program. *Clinical Biochemistry*, 46, pp 681-684.