

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dano oxidativo ao DNA induzido pela Aloisoleucina e outros metabólitos acumulados
na Doença da Urina do Xarope do Bordo: Efeito da L-carnitina

TATIANE CRISTINA HAUSCHILD

PORTO ALEGRE, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dano oxidativo ao DNA induzido pela Aloisoleucina e outros metabólitos acumulados
na Doença da Urina do Xarope do Bordo: Efeito da L-carnitina

Dissertação apresentada por **Tatiane
Cristina Hauschild** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador (a): Profa. Dra. Carmen Regla Vargas

PORTO ALEGRE, 2019

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de mestrado acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25.03.2019, pela banca examinadora constituída por:

Dra. Alana Pimentel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Alexandre Fuentesfria

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Alexandre Umpierrez Amaral

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

CIP - Catalogação na Publicação

Hauschild, Tatiane Cristina
Dano oxidativo ao DNA induzido pela Aloisoleucina e outros metabólitos acumulados na Doença da Urina do Xarope do Bordo: Efeito da L-carnitina / Tatiane Cristina Hauschild. -- 2019.
105 f.
Orientadora: Carmen Regla Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Doença da Urina do Xarope do Bordo. 2. Aloisoleucina. 3. L-Cartina. 4. Estresse Oxidativo. 5. Dano ao DNA. I. Regla Vargas, Carmen, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradeço ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que disponibilizou equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Carmen Regla Vargas, querida orientadora, pela confiança, por ser um exemplo de pessoa e profissional, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

Aos meus pais, Jorge e Vera, por todo amor e carinho, incentivo, apoio, e por acreditarem e investirem em mim. Ao meu irmão, Rafael, pelo exemplo que é e por estar sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos.

Ao meu noivo Guilherme, pelo incentivo, pelo excesso de paciência, pelo companheirismo, mas principalmente, por todo amor e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Alana, Bruna, Camila, Carlos Eduardo, Desirrèe, Gilian, Graziela, Jéssica, Maira, Marion, Tatiane), pelo apoio, discussões, pela troca de conhecimento e amizade.

Ao serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e auxílio para que este trabalho fosse realizado.

Aos colaboradores que foram de suma importância para que este projeto fosse concretizado: Professora Dinara Moura, Luiza Steffens da UFCSPA e Professora Vanusa Manfredini da Universidade Federal do Pampa.

Aos amigos queridos, pela torcida e carinho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

RESUMO

A Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD) é causada pela deficiência na atividade do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada, levando ao acúmulo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) leucina, isoleucina e valina e de seus α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKAs) correspondentes, bem como a presença da aloisoleucina (Allo), um biomarcador patognomônico da MSUD. Os pacientes afetados apresentam sintomas neurológicos severos, tais como coma, convulsões, edema e atrofia cerebral. Os mecanismos relacionados aos danos cerebrais ainda permanecem incertos, contudo, muitos estudos têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da doença. Neste contexto, foi recentemente demonstrado que, devido à restrição dietética de BCAAs (baixa ingestão de proteína), os pacientes MSUD possuem deficiência de L-Carnitina (L-Car), um composto com propriedades antioxidantes. Portanto, neste estudo, investigamos se a Allo e os outros metabólitos (BCAAs e BCKAs) acumulados na doença poderiam induzir danos ao DNA *in vitro*, avaliados pelo ensaio cometa, bem como o efeito da L-Car sobre o dano ao DNA. Também avaliamos os níveis urinários de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), um marcador bioquímico de dano oxidativo ao DNA, em pacientes MSUD submetidos a uma dieta restrita suplementada ou não com L-Car. Nossos resultados mostraram que todas as concentrações testadas de cada aminoácido e α -cetoácido (isolados ou incubados juntos) induziram dano ao DNA *in vitro*, comparado ao grupo controle e que o co-tratamento com L-Car reduziu significativamente esses efeitos. Observamos que a Allo induziu a maior classe de dano ao DNA e verificamos uma potencialização do dano ao DNA induzido pela ação sinérgica entre os metabólitos. No estudo *in vivo*, foi observado um aumento significativo nos níveis da 8-OHdG, o qual foi revertido pela suplementação com L-Car. Demonstramos pela primeira vez que o dano oxidativo ao DNA é induzido não somente pelos BCAAs e BCKAs, mas também pela Allo e que a L-Car confere efeito protetor antioxidante *in vitro*, bem como em pacientes MSUD.

Palavras-chave: Doença da Urina do Xarope do Bordo; Aloisoleucina; L-Carnitina; Dano ao DNA; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Oxidative damage to DNA induced by Alloisoleucine and other metabolites accumulated in the Maple Syrup Urine Disease: Effect of L-carnitine

Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is caused by a deficiency of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex activity leading to accumulation of the branched-chain amino acids (BCAAs) leucine, isoleucine and valine and their corresponding branched chain α -keto-acids (BCKAs), as well as the presence of the amino acid alloisoleucine (Allo), a pathognomonic biomarker of MSUD. The affected patients present severe neurological symptoms, such as coma, seizures, edema and cerebral atrophy. The mechanisms related to brain damage in MSUD still remain unclear, however, many studies have been shown the involvement of oxidative stress in the pathophysiology of the disease. In this context, it was recently demonstrated that, due to dietary restriction of BCAAs (low protein intake), MSUD patients have deficiency of L-Carnitine (L-Car), a compound with antioxidant properties. Thus, in this work, we investigated whether Allo and others metabolites (BCAAs and BCKAs) accumulated in the disease could induce *in vitro* DNA damage, evaluated by the comet assay, as well as the effect of L-Car upon DNA damage. We also evaluated urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels, an oxidative DNA damage biomarker, in MSUD patients submitted to a restricted of BCAAs diet supplemented or not with L-Car. Our results showed that all tested concentrations of each amino acid and alpha keto acid (isolated or incubated together) induced *in vitro* DNA damage, compared to the control group and the co-treatment with L-Car reduced significantly these effects. We found that Allo induced the higher DNA damage class and verified a potentiation of DNA damage induced by synergistic action between the metabolites. *In vivo*, it was observed a significant increase in 8-OHdG levels, which was reversed by L-Car supplementation. We demonstrated for the first time that oxidative DNA damage is induced not only by BCAAs and BCKAs, but also by Allo and that the L-Car confers antioxidant protective effect *in vitro*, as well as in MSUD patients.

Keywords: Maple Syrup Urine Disease; Alloisoleucine; L-Carnitine; DNA Damage; Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada.....	24
Figura 2. Interconversão dos diastereoisômeros da Isoleucina em Aloisoleucina.....	25
Figura 3. Subunidades e organização do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada	27
Figura 4. Estrutura química da L-Car.	38
Figura 5. Estresse oxidativo.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

Allo – Aloisoleucina

BCAA – do inglês *branched-chain amino acids*: Aminoácidos de cadeia ramificada

BCKA – do inglês *branched-chain α -keto acids*: α -cetoácidos de cadeia ramificada

BCKAD – do inglês *branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex*: Complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada

CAT – Catalase

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

CL/EM/EM – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

DI – Índice de dano

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GSH-Px – glutationa-peroxidase

HOCL – Ácido hipocloroso

H₂O – Água

HO₂[•] - Hidroperoxila

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HIC - α -hidroxiisocapróico

HMV – 2-hidroxi-3-metilvalérico

HIV – α -hidroxivalérico

Ile – Isoleucina

KIC – do inglês *α -Ketoisocaproic Acid*: Ácido α -cetoisocapróico

KMV – do inglês *α -Keto- β -Methylvaleric Acid*: Ácido α -ceto- β -metilvalérico

KIV – do inglês *α -Ketoisovaleric Acid*: Ácido α -cetoisovalérico

L-Car – L-Carnitina

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

Leu – Leucina

MDA – Malondialdeído

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO[•] - Óxido nítrico

MSUD – do inglês *Maple Syrup Urine Disease*: Doença da Urina do Xarope do Bordo

O₂ – Oxigênio molecular

O₂^{•-} - Ânion radical superóxido

OH[•] - Radical hidroxila

ONOO⁻ - Peroxinitrito

¹O₂ – Oxigênio singlet

O₃ – Ozônio

8-OHdG – 8 - hidroxil - 2' - deoxiguanosina

RL – Radicais livres

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido-dismutase

SUS – Sistema Único de Saúde

Val – Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	21
1.2 Doença da Urina do Xarope do Bordo	22
1.2.1 Histórico.....	22
1.2.2 Etiologia e Aspectos Genéticos.....	23
1.2.3 Via metabólica.....	26
1.2.4 Manifestações Clínicas e Classificação	28
1.2.5 Diagnóstico	30
1.2.6 Tratamento.....	31
1.2.7 Fisiopatologia do dano neurológico.....	33
1.3 Radicais livres.....	35
1.4 Defesas antioxidantes.....	36
1.4.1 L-Carnitina.....	37
1.5 Estresse oxidativo.....	39
1.5.1 Dano ao DNA	40
1.6 Estresse oxidativo e Doença da Urina do Xarope do Bordo	41
2. OBJETIVOS	45
2.1 Objetivos gerais	47
2.2 Objetivos específicos	47
3. RESULTADOS	49
3.1 CAPÍTULO 1- ARTIGO 1: DNA damage induced by alloisoleucine and other metabolites in maple syrup urine disease and protective effect of L-carnitine.....	51
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÃO.....	75
6. PERSPECTIVAS	79
7. REFERÊNCIAS	83

8. ANEXOS.....	95
8.1 ANEXO 1: Solicitação de investigação laboratorial dirigida para pacientes.....	97
8.2 ANEXO 2: Ficha de dados de indivíduos controle	99
8.3 ANEXO 3: Termo de consentimento livre e esclarecido pacientes MSUD	100
8.4 ANEXO 4: Termo de consentimento livre e esclarecido:indivíduos controle	103
8.5 ANEXO 5: Parecer Comitê de Ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	105

1.1 Erros Inatos do Metabolismo

Em 1908, Sir Archibald Garrod, ao identificar a natureza genética e bioquímica de quatro doenças (alcaptonúria, pentosúria, albinismo e cistinúria), criou a expressão Erros Inatos do Metabolismo (EIM), além de reconhecer, juntamente com Bateson, geneticista inglês, a hereditariedade autossômica recessiva dessas condições metabólicas (Scriver et al., 2001). No entanto, apenas em 1941, a relação entre os aspectos bioquímicos e genéticos puderam ser melhor esclarecidos, quando Beadle e Tatum propuseram a hipótese “um gene/uma enzima”, onde um gene específico está relacionado a síntese de uma cadeia polipeptídica específica, permitindo explicar a causa de mutações nos genes das enzimas envolvidas (Mueller e Young, 1995). Desde então, foram descritos mais de 500 EIM, o que compreende cerca de 10% do total das doenças genéticas, maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, armazenamento ou transporte de moléculas no organismo (Jimenez-Sanchez et al., 2001; Baric et al., 2001).

Esses defeitos hereditários do metabolismo ocorrem pela falta ou síntese anômala de uma determinada proteína, geralmente uma enzima, capaz de acarretar a interrupção de vias metabólicas. Em consequência deste bloqueio metabólico, pode ocorrer acúmulo de substratos da enzima deficiente e seus derivados, bem como diminuição da síntese do produto ou o desvio do substrato para uma via metabólica alternativa, onde haverá formação e acúmulo de produtos secundários tóxicos, que poderão comprometer os processos celulares. Dependendo da via afetada, a sintomatologia desenvolvida é variável e geralmente inespecífica, apresentando desde quadros assintomáticos até os tão graves que podem implicar na morte neonatal ou deixar sequelas importantes, especialmente no sistema nervoso central (SNC). De uma maneira geral, os EIM possuem uma repercussão clínica severa que se manifesta ainda durante a infância (Scriver et al., 2001).

Embora individualmente raras, coletivamente estas doenças apresentam alta frequência, acometendo aproximadamente 1:1000 recém-nascidos vivos, sendo a maioria herdadas de modo autossômico recessivo (Scriver et al., 2001). Mesmo com grande heterogeneidade entre si, Saudubray e Charpentier (2001), classificaram os EIM em três grandes grupos com base em sua fisiopatologia:

Grupo I: Distúrbios na síntese ou degradação de macromoléculas complexas, fazem parte deste grupo as doenças lisossômicas de depósito (ex: doença de Fabry, doença de Gaucher etc.) e as desordens peroxissomais (ex: doença de Refsum, adrenoleucodistrofia ligada ao X etc.).

Grupo II: Doenças com déficit de energia, incluindo doenças de depósito de glicogênio, acidemias lácticas congênitas, defeitos de gliconeogênese, defeitos de oxidação de ácidos graxos e doenças mitocôndrias de cadeia respiratória.

Grupo III: Erros inatos do metabolismo intermediário, que incluem as aminoacidopatias (ex: doença da urina do xarope do bordo, fenilcetonúria etc.), as acidemias orgânicas (ex: acidemia metilmalônica, acidemia propiônica etc.), os defeitos no ciclo da uréia (ex: argininemia, citrulinemia etc.) e as intolerâncias a açúcares (ex: galactosemia etc.).

As doenças incluídas neste último grupo possuem relação com a ingestão alimentar e podem levar à intoxicação aguda ou crônica, causada pelo acúmulo de componentes tóxicos e de metabólitos devido ao bloqueio de rotas metabólicas, não prejudicam o desenvolvimento embrionário, apresentando sintomas intermitentes que podem ser desencadeados por alterações do estado catabólico, como infecções agudas, ou ingestão aumentada dos alimentos restritos em cada caso (Saudubray e Charpentier, 2001). Estudos revelam que aproximadamente um terço dos EIM corresponde a aminoacidopatias, alvo de estudo desse trabalho, outro terço as acidemias orgânicas e o terço final a todos os outros EIM (Hoffmann, 1994).

1.2 Doença da Urina do Xarope do Bordo

1.31.2.1 Histórico

John Menkes e colaboradores (1954) descreveram uma doença neurodegenerativa em quatro membros de uma mesma família caracterizada por edema cerebral, convulsões, espasticidade e sofrimento respiratório. O aparecimento dos sintomas iniciava na primeira semana de vida e evoluindo para

óbito dentro de três meses. A urina destes pacientes apresentava um forte odor de xarope do bordo, cheiro adocicado, parecido com açúcar queimado ou caramelo. De acordo com essa característica mais proeminente, a nova síndrome foi denominada, então, Doença da Urina do Xarope do Bordo (“Maple Syrup Urine Disease” – MSUD). Dancis e colaboradores (1959) identificaram que os compostos acumulados na urina e plasma dos pacientes eram os aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina e os seus correspondentes α -cetoácidos, e, dessa forma, a doença também foi chamada de cetoacidúria de cadeia ramificada. Posteriormente, na década de 60, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou através de estudos enzimáticos em leucócitos e fibroblastos de pacientes afetados que o bloqueio metabólico na MSUD ocorria na descarboxilação dos α -cetoácidos de cadeia ramificada, esclarecendo a causa bioquímica da MSUD (Dancis et al., 1960). A restrição rigorosa de aminoácidos de cadeia ramificada na dieta foi proposta como forma de tratamento em 1964 (Snyderman, 1964).

1.2.2 Etiologia e Aspectos Genéticos

A MSUD ou cetoacidúria de cadeia ramificada é uma desordem metabólica hereditária de caráter autossômico recessivo, caracterizada por uma deficiência na atividade do complexo enzimático da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada “Branched-Chain α -Keto Acid Dehydrogenase”- BCKAD (Figura 1). A deficiência deste complexo enzimático em descarboxilar os α -cetoácidos de cadeia ramificada (“Branched-Chain α -Keto Acids”- BCKAs) α -cetoisocapróico (“ α -Ketoisocaproic Acid”- KIC), α -ceto- β -metilvalérico (“ α -Keto- β -Methylvaleric Acid” - KMV) e α -cetoisovalérico (“ α -Ketoisovaleric Acid”- KIV) leva ao acúmulo tecidual destes metabólitos e de seus aminoácidos precursores de cadeia ramificada (“Branched Chain Amino Acids”- BCAAs) leucina (Leu), isoleucina (Ile) e valina (Val), bem como a presença do aminoácido aloisoleucina (Allo), formado a partir da racemização da Ile (Figura 2) (Chuang e Shih, 2001; Treacy et al.,1992). Da mesma forma são encontrados acumulados, mas em menor extensão, os derivados hidroxilados α -hidroxiisocapróico (HIC), 2-hidroxi-3-metilvalérico (HMV) e α -hidroxivalérico (HIV), produzidos pela redução dos seus α -cetoácidos (Treacy et al.,1992).

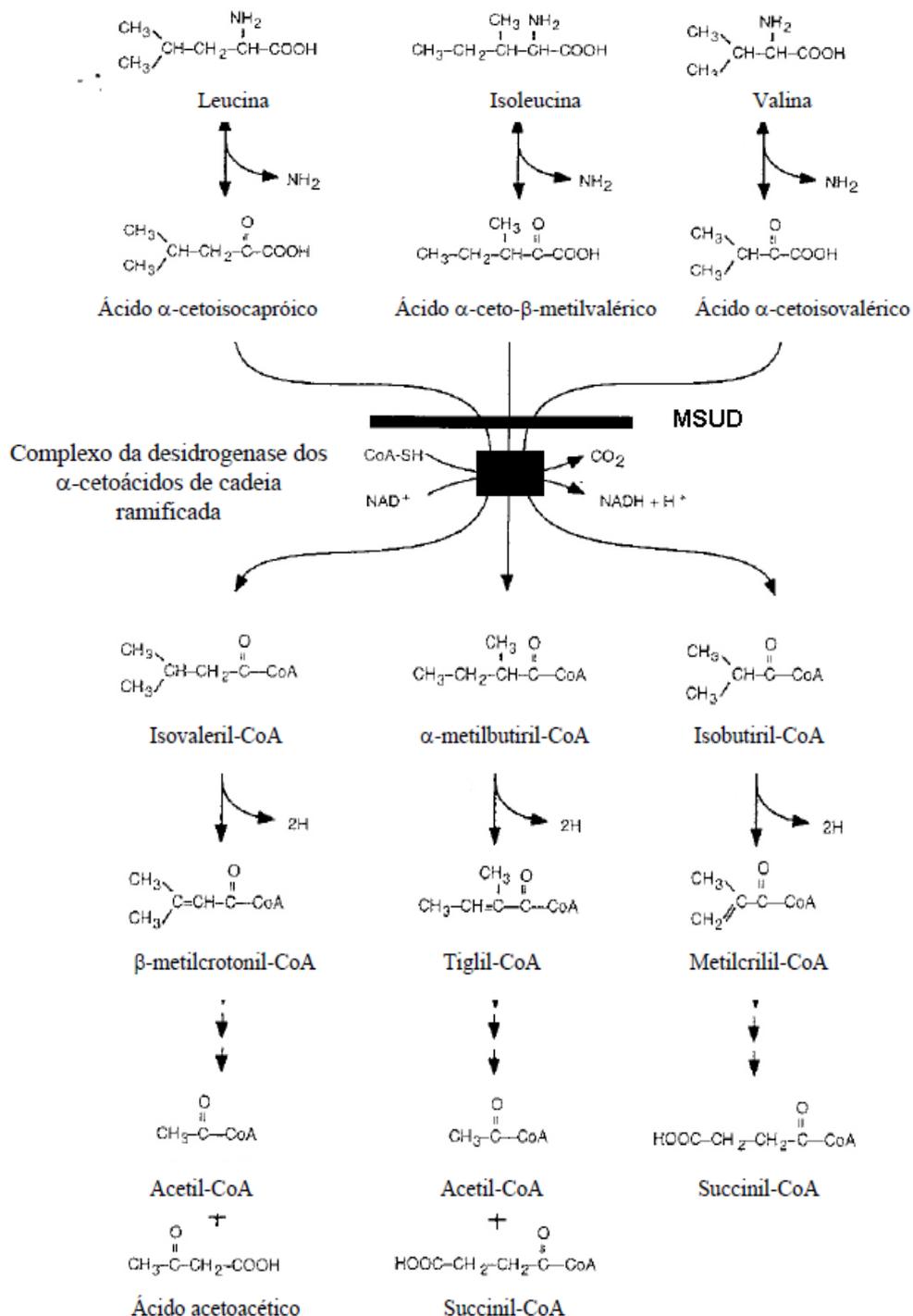


Figura 1. Rota metabólica dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, indicando o bloqueio metabólico que ocorre na Doença da Urina do Xarope do Bordo, situado no complexo da desidrogenase dos α-cetoácidos de cadeia ramificada (Adaptado de Scriver et al., 2001).

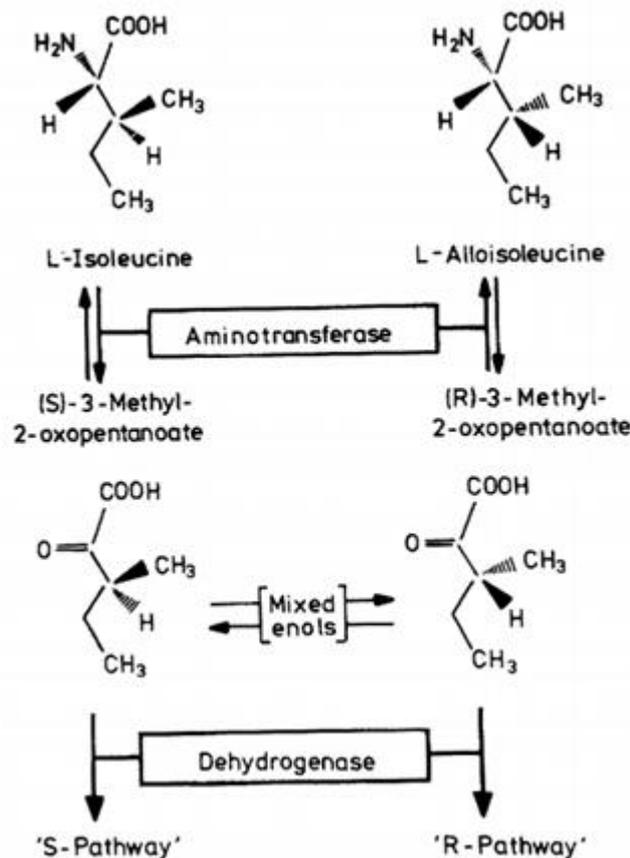


Figura 2. Interconversão dos diastereoisômeros da Isoleucina em Aloisoleucina nos passos iniciais do metabolismo (Adaptado Schadewaldt et al., 1990).

Estima-se a incidência mundial da MSUD em aproximadamente 1 para cada 185.000 recém-nascidos vivos (Chuang e Shih, 2001). Embora seja uma desordem rara, é altamente prevalente nas populações Menonitas dos condados de Lancaster e Lebanon no estado da Pensilvânia/EUA, com uma frequência estimada de 1:200 nascidos vivos (Morton et al., 2002). No Brasil, considera-se uma incidência média de 1:100.000, nascidos vivos (Herber et al., 2015).

De acordo com a Base de Dados de Mutação Genética Humana, até o momento, 259 mutações já foram descritas nas subunidades catalíticas do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada humano, o qual é codificado por seis locos genéticos (E1 α , E1 β , E2, E3, BCKAD quinase e BCKAD fosfatase) (Imtiaz et al., 2017). Com base no locus afetado, a MSUD é classificada em quatro grupos moleculares: tipo IA (OMIM#608348) para as mutações do gene BCKDHA (subunidade E1 α); tipo IB (OMIM#248611) para as mutações observadas no gene BCKDHB (subunidade E1 β); tipo II (OMIM#248610) para mutações no gene

DBT (subunidade E2) e tipo III (OMIM# 238331) para mutações no gene DLD (subunidade E3) (Nellis e Danner, 2001; Quental et al., 2008 a,b). A subunidade E3 é comum aos complexos piruvato e α -cetoglutarato desidrogenase e sua deficiência, portanto, gera fenótipo clínico diverso e mais grave, com poucos casos descritos na literatura (Matuda et al., 1984; Robinson et al., 1981). Como não há relatos de uma mutação prevalente entre os pacientes MSUD, exceto em comunidades específicas, a pesquisa molecular se baseia geralmente no sequenciamento completo dos genes BCKDHA, BCKDHB e DBT.

1.2.3 Via metabólica

O BCKAD é um complexo enzimático localizado na membrana interna da mitocôndria das células de mamíferos, possuindo três componentes catalíticos, ilustrados na Figura 3: E1, uma descarboxilase de α -cetoácidos de cadeia ramificada heterotetramérica, dependente de tiamina pirofosfato ($\alpha 2\beta 2$); E2, uma dihidrolipoil trasacilase; e E3, uma di-hidrolipoamida desidrogenase homodimérica. Além disso, a atividade do complexo é controlada por meio de duas enzimas regulatórias: uma fosfatase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada, hábil para defosforilação da proteína E1 e ativação do complexo enzimático e uma quinase da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada, que através da fosforilação de uma subunidade do complexo E1 é capaz de inativar o BCKAD (Peinemann e Danner, 1994; Chuang, 1998; Chuang e Shih, 2001).

A atividade do complexo enzimático BCKAD é o passo irreversível da via catabólica, sendo responsável por regular o fluxo dos BCAAs utilizados para produção de energia (Chuang e Shih, 2001).

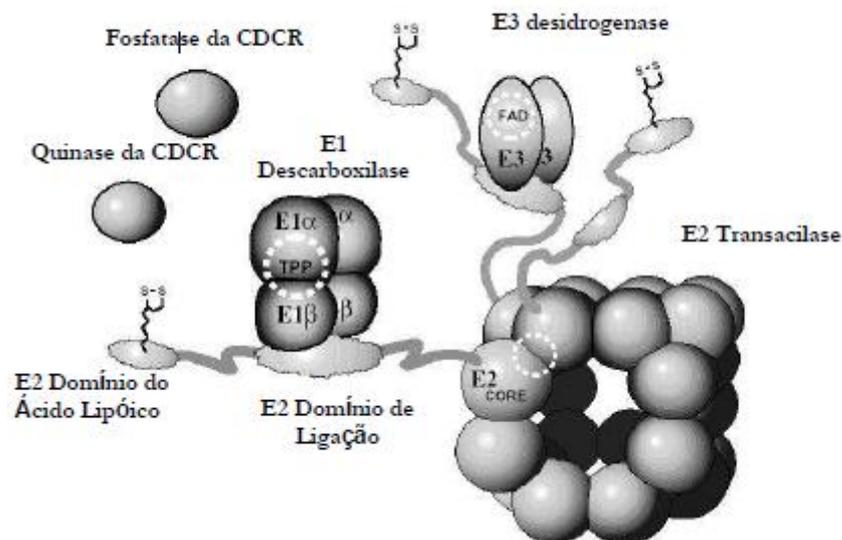


Figura 3. Subunidades e organização do complexo da desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (BCKAD), que se divide em três sítios catalíticos: E1, descarboxilase de α -cetoácidos de cadeia ramificada, dependente de tiamina pirofosfato; E2, di-hidrolipoil transacilase; E3, di-hidrolipoamida desidrogenase, ligada ao FAD. Os sítios ativos ou de ligação ao cofator em cada componente da enzima estão circundados (Adaptado de Chuang, 1998).

Os aminoácidos Leu, Ile e Val são classificados como BCAAs essenciais, provenientes exclusivamente através da alimentação, contribuindo com mais de 60% na concentração de aminoácidos totais no plasma (Chuang e Shih, 2001). O principal destino metabólico desses aminoácidos é a sua incorporação na síntese proteica (Schadewaldt e Wendel, 1997). Além disso, também são utilizados como fonte de energia alternativa durante o catabolismo de proteína muscular endógena ou quando consumidos em excesso de necessidades anabólicas (Frazier et al., 2014; Sperringer et al., 2017).

A via de catabolismo dos BCAAs tem início com o transporte destes aminoácidos para o interior da célula através do sistema L de transporte sódio-independente localizado na membrana plasmática, onde sofrem três reações iniciais comuns na sua via metabólica (Prentki, 1965). Geralmente o catabolismo completo dos metabólitos requer o deslocamento dos mesmos, uma vez que as enzimas responsáveis pela degradação desses aminoácidos são encontradas em diversos tecidos (Sperringer et al., 2017).

O primeiro passo é uma transaminação reversível dos BCAAs, catalisada pela aminotransferase de cadeia ramificada, que são tanto citosólicas quanto

mitocôndrias, produzindo os seus respectivos α -cetoácidos. Quando ocorre no citosol, os α -cetoácidos são então translocados para o interior da mitocôndria por um transportador específico. No interior da mitocôndria, os BCKAs são descarboxilados oxidativamente de forma irreversível pelo complexo multienzimático BCKAD. Esta reação produz, por fim, acil CoAs de cadeia ramificada, metabolizados por vias específicas, respectivos de cada aminoácido: acetil-CoA e acetoacetato decorrente do catabolismo da leucina (cetogênico); succinil-CoA da valina (glicogênico) e acetil-CoA e succinil-CoA resultante do metabolismo da isoleucina (cetogênico e glicogênico, respectivamente), além de CO_2 e NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) na proporção de 1:1:1 (Danner et al., 1979; Chuang e Shih, 2001). Portanto, os produtos catabólicos do BCAAs são utilizados como substratos para a síntese de ácidos graxos e colesterol para a produção de energia, via acetoacetato e succinil-CoA (Chuang e Shih, 2001).

1.2.4 Manifestações Clínicas e Classificação

A manifestação clínica da MSUD é variável, dependendo da variante da doença (forma clássica severa a formas variantes moderadas). A classificação da doença leva em consideração a idade de início dos sintomas, apresentação clínica, tolerância à leucina, atividade enzimática residual e resposta a administração de tiamina. Desta forma, os pacientes MSUD podem ser classificados em cinco fenótipos: clássico, intermediário, intermitente, tiamina-responsivo e deficiente em lipoamida desidrogenase (Chuang e Shih, 2001).

A forma neonatal clássica é a mais grave, mais frequente e de evolução rápida da doença, representando aproximadamente 80% dos casos de MSUD. Os recém-nascidos afetados apresentam apenas 0-2% da atividade normal do BCKAD, resultando em concentração de Leu superiores a 2000 $\mu\text{mol/L}$. O período assintomático pode variar de um dia a duas semanas, dependendo do grau da deficiência do complexo enzimático BCKAD e da quantidade de proteína ingerida. Porém, os pacientes apresentam as primeiras manifestações clínicas da doença entre o 4^o e o 7^o dia de vida, com odor de açúcar queimado na urina, letargia e recusa alimentar, evoluindo para perda de peso e cetocidose. Se não tratados, o quadro clínico pode evoluir para edema cerebral, opistótono, convulsões, hipotonia,

irritabilidade, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e disfunção neurológica em suas diferentes formas de expressão. Achados neuropatológicos característicos desta doença incluem edema generalizado e hipomielinização/desmielinização, principalmente durante as crises de descompensação metabólica (Chuang e Shih, 2001; Ogier de Baulny, 2002). A maioria dos pacientes vai a óbito nos primeiros meses de vida devido às crises metabólicas recorrentes e deterioração neurológica (Chuang e Shih, 2001; Morton et al., 2002).

Os pacientes com o fenótipo intermediário da MSUD apresentam elevações persistentes dos BCAAs, porém menos pronunciada que na forma clássica. A atividade residual do complexo é normalmente maior do que a apresentada no fenótipo clássico e varia de 3 a 30% do normal e geralmente os pacientes não apresentam manifestações agudas no período neonatal. O diagnóstico, normalmente, é feito em torno dos dois anos de vida e os pacientes apresentam atraso no desenvolvimento, convulsões e episódios de cetoacidose (Chuang e Shih, 2001).

Na forma intermitente da doença, os pacientes apresentam 5-20% da atividade normal do BCKAD e não apresentam desenvolvimento psicomotor afetado. Quando assintomáticos, os níveis de BCAAs são normais no plasma. Porém, da mesma maneira que a forma intermediária, o diagnóstico é tardio entre 5 meses e 2 anos de idade após crises metabólicas agudas, normalmente ocasionadas por um quadro de estresse e/ou infecção ou devido a sobrecarga proteica na dieta, o que pode acarretar o desenvolvimento de características clínicas e bioquímicas semelhantes à forma clássica (Chuang e Shih, 2001).

Na forma responsiva à tiamina os pacientes apresentam melhor quadro clínico, uma vez que apresentam 2-40% da atividade normal do BCKAD. Os pacientes com fenótipo responsivo à tiamina, em geral, não exibem doença neonatal aguda e as manifestações clínicas se assemelham às da forma intermediária, com atraso no desenvolvimento psicomotor. As concentrações dos BCAAs (2-5 mM) podem ser reduzidas drasticamente para níveis normais com doses de 10 a 1000 mg/dia de tiamina associada à dieta restrita (Chuang e Shih, 2001).

A deficiência de lipoamida desidrogenase (E3-deficiente) é uma desordem rara, clinicamente semelhante à da forma intermediária, caracterizada por atraso no desenvolvimento psicomotor e acidose láctica. Os pacientes apresentam deficiência

residual na atividade do BCKAD de 0 a 25% comparada ao normal, concomitantemente com um aumento de piruvato, α -cetoglutarato e BCAAs. Após o aparecimento de acidose láctica persistente, entre 8 semanas e 6 meses de vida, ocorre deterioração neurológica progressiva característica, hipotonia, atraso no desenvolvimento e encefalopatia (Chuang e Shih, 2001).

1.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico precoce é o fator determinante do sucesso no tratamento de pacientes com MSUD. Vários países vêm utilizando o método de espectrometria de massa em Tandem para triagem neonatal, popularmente conhecido Teste do Pezinho, permitindo o diagnóstico precoce da MSUD já nos primeiros dias de nascimento, geralmente entre o 3º ao 7º dia de vida, quando os pacientes são ainda assintomáticos ou apresentam poucos sintomas (Simon et al., 2006). No Brasil, o Teste do Pezinho fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) não contempla a MSUD, sendo este fornecido apenas por laboratórios privados (Souza et al., 2002).

No entanto, o diagnóstico da MSUD é fundamentalmente laboratorial através da identificação de altas concentrações plasmáticas de Leu, Ile, e Val e de níveis elevados na urina de seus respectivos α -cetoácidos. No momento do diagnóstico os aminoácidos Ile e Val encontram-se em concentrações plasmáticas de até 1 mM, enquanto, a Leu pode alcançar concentrações plasmáticas de até 5 mM, sendo sua quantificação o principal critério para diagnóstico e monitoramento do tratamento (Bremer et al., 1981).

Outro achado característico da doença, principalmente em pacientes com a forma clássica que sofreram crises metabólicas severas, é a presença da Allo. A Allo, aminoácido não proteico, é um constituinte normal do plasma humano. Embora não esteja apenas correlacionado com a MSUD, é patognomômico da doença, já que é indetectável no plasma de indivíduos saudáveis devido à interferentes e à sua baixa concentração. Altos níveis plasmáticos de Allo persistem por vários dias após episódios de crises de descompensação metabólica, sendo permanentemente detectável nos pacientes mesmo quando as concentrações de Ile são baixos, devido à excreção renal ser bastante lenta, apresentando como valor de referência 5 μ mol/L para a detecção de MSUD (Chuang e Shih, 2001).

O perfil de aminoácidos pode ser determinado através cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL/EM/EM), enquanto os α -cetoácidos podem ser detectados pela análise de ácidos orgânicos na urina através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) (Chuang e Shih, 2001; Chuang et al., 2006). O Laboratório para Diagnóstico de Erros Inatos do Metabolismo do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre constitui-se em centro de referência nacional para o diagnóstico da MSUD, disponibilizando a análise quantitativa de aminoácidos por HPLC ou auto-analisador, e por CG-MS (Wajner et al., 2004).

A confirmação do diagnóstico é feita através da medida da atividade do complexo BCKAD em leucócitos periféricos, cultura de fibroblastos ou cultura de linfoblastos de pacientes. O gene envolvido no funcionamento do complexo enzimático de cadeia ramificada é conhecido, portanto é possível estudar as mutações envolvidas na causa da doença em laboratórios especializados em genética molecular. Essas informações são importantes nos casos de necessidade de diagnóstico pré-natal (Chuang e Shih, 2001; Peinemann e Danner, 1994; Strauss et al, 2006).

O diagnóstico pré-natal para as famílias em que já foi identificada a mutação envolvida pode ser realizado em cultura de células do fluido amniótico retiradas por amniocentese entre a 14^a e a 18^a semana de gestação, ou por análise direta do tecido em vilosidades coriônicas e cultura de células de vilosidades coriônicas (Chuang e Shih, 2001).

1.2.6 Tratamento

Essencialmente, o tratamento da MSUD tem por objetivo restaurar a homeostase do metabolismo intermediário e evitar as crises de descompensação metabólica aguda.

Do ponto de vista clínico, existem dois tipos de tratamento: o tratamento da fase aguda (durante crises de descompensação metabólica) e o tratamento da fase de manutenção. A descompensação metabólica aguda pode ser desencadeada por períodos de estresse como infecções, febre ou outras doenças. Três aspectos são importantes no manejo das crises metabólicas: a rápida remoção dos metabólitos

tóxicos (diálise peritoneal, a transfusão exsanguínea e a hemodiálise), o suporte nutricional e a supressão do catabolismo e/ou a promoção do anabolismo, através da administração parenteral de uma solução contendo eletrólitos, glicose, lipídios, vitaminas e uma mistura de aminoácidos isenta de BCAAs (Stauss et al., 2006).

Na fase de manutenção o tratamento preconizado à doença é uma dieta hipercalórica com restrição na ingestão de proteínas, utilizando fórmulas específicas contendo aminoácidos essenciais, exceto aqueles acumulados na MSUD, além de vitaminas e minerais. Tal restrição é adotada objetivando que esses aminoácidos essenciais (por exemplo, triptofano, tirosina, fenilalanina, metionina e treonina) venham a competir com os BCAAs pelo transportador de aminoácidos neutros no cérebro, visando diminuir o aporte de BCAAs para o cérebro (Strauss et al., 2010). O tratamento deve ser iniciado o mais cedo possível, ainda no período neonatal, e mantido por toda a vida do paciente. Para detecção dos pacientes pertencentes ao grupo responsivo à tiamina, é administrada uma dose de tiamina (50-300 mg/dia) nas três primeiras semanas de início do tratamento. Dessa forma, objetiva-se normalizar as concentrações de BCAAs, chegando o mais próximo possível dos valores de referência, que se encontram entre 80-200 $\mu\text{mol/L}$ para a leucina, 40-90 $\mu\text{mol/L}$ para isoleucina e 200-425 $\mu\text{mol/L}$ de valina (Lepage et al., 1997) ou, preferencialmente, devem variar para a leucina entre 100 e 300 $\mu\text{mol/L}$, isoleucina de 200-400 $\mu\text{mol/L}$ e valina de 200-400 $\mu\text{mol/L}$, que são os limites aceitáveis sem prejudicar o desenvolvimento dos pacientes, principalmente o neuronal (Chuang e Shih, 2001; Wendel e Baulny, 2006). É importante ressaltar que um diagnóstico precoce e um tratamento efetivo são cruciais para o desenvolvimento e a sobrevivência destes pacientes, já que os danos neurológicos causados durante as crises metabólicas agudas e/ou pelo acúmulo dos metabólitos envolvidos na MSUD são irreversíveis e podem levar à óbito nos primeiros meses de vida (Chuang e Shih, 2001).

No entanto, o excesso de restrição dietética pode ocasionar outras condições, como atraso no crescimento e desenvolvimento e levar a uma diminuição na ingestão de antioxidantes, como L-carnitina, selênio, contribuindo para o dano oxidativo já descrito na doença (Sitta et al., 2014).

Outra opção terapêutica proposta recentemente é o transplante hepático. Ele possibilita ao paciente uma dieta livre (Serra et al., 2010), uma vez que levaria a um

aumento de cerca de 10% do normal do BCKAD sobre o organismo, podendo ser suficiente para manter a homeostase dos aminoácidos. No entanto a experiência relacionada a essa prática é muito limitada quando levado em consideração a escassez de fígado para transplante, problemas cirúrgicos, bem como os riscos de imunossupressão (Mazariegos et al., 2012; Feier et al., 2016; Takano et al., 2017).

Novas terapias estão sendo estudadas para o tratamento de MSUD, utilizando substâncias como antioxidantes, fenilbutirato de sódio e L-carnitina. Futuramente novas diretrizes para o tratamento podem ser abordadas a fim de melhorar o prognóstico desses pacientes (Frazier et al., 2014).

1.2.7 Fisiopatologia do dano neurológico

Os mecanismos pelos quais os BCAAs e seus BCKAs são tóxicos ao SNC ainda não estão completamente esclarecidos, pois a complexidade do desenvolvimento cerebral, as concentrações alcançadas pelos metabólitos tóxicos e o estágio do desenvolvimento do cérebro no momento em que eles atuam, são alguns fatores que prejudicam o esclarecimento desses efeitos. Tais mecanismos incluem privação de energia, redução da absorção de aminoácidos essenciais no tecido cerebral, desregulação osmótica, alterações nas concentrações de glutamato, aspartato e ácido gama aminobutírico (GABA) no cérebro, apoptose de células neurais e estresse oxidativo (Walterfang et al., 2013; Scaini et al., 2014).

Estudos demonstram que o aumento sérico de Leu e o KIC no espaço extracelular alteram a concentração cerebral dos aminoácidos transferidos pelo transportador de aminoácidos neutros de cadeia longa (sistema L), que incluem a Ile, Val, metionina, triptofano, tirosina, fenilalanina e glutamina, afetando a biossíntese de neurotransmissores como a serotonina e as catecolaminas (Wajner et al., 2000; Araújo et al., 2001; Zielke et al., 1997).

A presença de um excesso de KIC ocasiona uma diminuição de 50% de conteúdo de glutamato em astrócitos, aumentando a sua velocidade de oxidação através da transferência do grupamento amino do glutamato para o KIC levando à formação de Leu e α -cetoglutarato que é posteriormente oxidado no ciclo de Krebs (Zielke et al., 1997). Além do aumento da velocidade de oxidação do glutamato, níveis elevados de KIC e BCAAs são capazes de diminuir a captação de glutamato

por vesículas sinápticas em cérebro de ratos (Tavares et al., 2000) e também aumentam a oxidação e diminuem a síntese de glutamina em cultura de astrócitos (Youdkoff et al., 1994).

Em 1961, Tashian e colaboradores demonstraram que o KIC, KIV e Leu inibem competitivamente a atividade da enzima glutamato descarboxilase em homogeneizado de cérebro de ratos. Desta forma, estes metabólitos poderiam reduzir a produção do principal neurotransmissor, GABA. Jouvett et al. (2000) verificaram uma diminuição da viabilidade celular em fibroblastos de pacientes com MSUD pela presença dos BCAAs e BCKAs. Segundo Gibson e Blass (1976), KIC inibi o consumo de oxigênio no cérebro, provocando deficiência na formação de mielina no cerebelo de ratos. Outros estudos revelaram um efeito inibitório dos metabólitos acumulados na doença sobre a produção de CO₂ e a atividade do complexo I-III da cadeia respiratória com conseqüente déficit energético no tecido neuronal (Chuang e Shih, 2001; Sgaravatti et al., 2003, Ribeiro et al., 2008). Scaini e colaboradores demonstraram que a administração crônica de BCAAs prejudica a memória espacial e aumenta o fator neurotrófico cerebral em modelo animal de MSUD, diminui o fator de crescimento nervoso em hipocampo (Scaini et al., 2013a; Scaini et al., 2013b) e aumenta a razão Pro-BDNF/BDNF-Total cerebral (Scaini et al., 2015). Além do mais, evidências crescentes demonstram que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia da MSUD (Barschak et al., 2007, 2008a; Mescka et al., 2013; Guerreiro et al., 2015).

Alterações comportamentais também têm sido atribuídas aos BCAAs e BCKAs acumulados na MSUD. É relatado que as deficiências na aprendizagem, comportamento e memória são causadas, em parte, por alterações na função do sistema colinérgico (Scaini et al., 2012). Em 2010, Walsh e colaboradores observaram em uma paciente com MSUD alterações no perfil neurocognitivo, déficit no raciocínio não verbal e visual espacial e déficit de atenção. Além das alterações neurocognitivas, pacientes MSUD na fase adulta apresentam uma elevada de distúrbios neuropsiquiátricos, como ansiedade e depressão (Walterfang et al., 2013, Muelly et al., 2013).

1.3 Radicais livres

Radicaís livres (RL) são estruturas químicas com um ou mais elétrons não pareados em sua última camada de valência. Essa característica os torna moléculas energeticamente instáveis e extremamente reativas, apresentando uma enorme capacidade de combinar-se de forma inespecífica com várias moléculas integrantes da estrutura celular (Halliwell e Gutteridge, 2007; Valko et al., 2007). Diversas são as fontes geradoras de RL nos sistemas biológicos, eles podem ser formados por influências externas, tais como dieta inadequada, consumo exagerado de álcool, tabaco, exposição à radiação ionizante e eletromagnética e poluição atmosférica ou formados endogenamente, por reações redox ou por processos de catálise enzimática (subprodutos do metabolismo aeróbico) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Dröge, 2002).

As espécies reativas do oxigênio são formadas em grande quantidade pela respiração celular, na mitocôndria, principalmente nos complexo I e III da cadeia respiratória, onde aproximadamente (2-5%) do O₂ (oxigênio molecular) utilizado não é completamente reduzido à H₂O (água), podendo ser convertido a intermediários reativos como o ânion radical superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (OH[•]) hidroperoxila (HO₂[•]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Halliwell e Gutteridge, 2007). É importante enfatizar que em processos patológicos, a formação destas espécies reativas pode ser exacerbada (Zablocka e Janusz, 2008).

O radical hidroxila (OH[•]) é o radical de oxigênio mais reativo, que uma vez formado reage rapidamente e inespecificamente, podendo atacar e lesar qualquer biomolécula (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não somente os radicais formados pela redução do O₂ (O₂^{•-} e OH[•]), mas também alguns não-radicaís dele derivados, como o peróxido de hidrogênio H₂O₂, o ácido hipocloroso (HOCL), o oxigênio singlet (¹O₂), e o ozônio (O₃) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além disso, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO[•]) e o peroxinitrito (ONOO⁻) as principais representantes (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As ERO e ERN estão presentes tanto em processos fisiológicos normais quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente essas espécies reativas

apresentam diversas funções relevantes, incluindo a comunicação intracelular, defesa contra agentes infecciosos, apoptose, dentre outros. Por outro lado, quando há uma superprodução dessas espécies ou uma remoção ineficiente, é gerado um estado pró-oxidante (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Dessa forma, espécies reativas têm o potencial de reagir com proteínas, inibindo a atividade de diversas enzimas e alterando a sua função, promover oxidação lipídica, ou seja, podem reagir com a bicamada lipídica, e também com proteínas das membranas celulares, alterando as características de fluidez de membrana e levando, assim, à liberação de subprodutos tóxicos; oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de reagir com o DNA e RNA, causando alterações de bases púricas e pirimídicas, levando a mutações somáticas e a alterações na transcrição gênica (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.4 Defesas antioxidantes

A fim de proteger o organismo da injúria celular causada pelas espécies reativas, os seres vivos dispõem de mecanismos de defesas antioxidantes para prevenir, retardar e/ou remover o acúmulo das mesmas, agindo de maneira tanto independente quanto cooperativa, ou mesmo sinérgica. Os sistemas de defesa antioxidante têm como objetivo o equilíbrio entre a produção fisiológica e a remoção dessas espécies, sendo classificados em defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Ahmed, 2005). Dentre as principais enzimas antioxidantes que removem e protegem as células contra os RL estão incluídas: catalase (CAT), a superóxido-dismutase (SOD) e a glutatona-peroxidase (GSH-Px) (Tabela 1).

Em relação às defesas antioxidantes não enzimáticas, fazem parte desse grupo moléculas sintetizadas pelo próprio organismo como ácido úrico, bilirrubina, glutatona e melatonina, ou por compostos obtidos através da dieta, como as vitaminas, como por exemplo, vitamina A, C, E riboflavina e tiamina, bem como L-carnitina, flavonoides, selênio, polifenóis e carotenoides (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Esses antioxidantes apresentam, direta ou indiretamente, capacidade eficaz de defesa, atuando a fim de manter o estado de homeostase celular. O mecanismo de ação dos compostos não enzimáticos para proteger o organismo contra os

radicais livres é bastante diverso, ligando íons como o ferro e cobre, tornando-os menos reativos, estimulando a produção de outras defesas antioxidantes, podendo envolver o sequestro/inibição de ERO ou precursores, reparo do DNA, remoção do oxigênio presente no meio entre outros (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Tabela 1. Reações das defesas antioxidantes enzimáticas: a) Reação de dismutação do íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$); b) Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a oxigênio no estado fundamental (O_2); c) Reação de redução de peróxidos (LOOH) e álcoois (LOH), catalisada pela GPx.

Defesas antioxidantes enzimáticas		
	Mecanismo	Reação
Superóxido dismutase (SOD)	SOD catalisa a dismutação de dois radicais $O_2^{\bullet-}$ (atua como <i>scavenger</i> de íons $O_2^{\bullet-}$).	a) $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightleftharpoons{SOD} H_2O_2 + O_2$
Catalase (CAT)	CAT catalisa diretamente a decomposição do H_2O_2	b) $2 H_2O_2 \xrightleftharpoons{CAT} 2 H_2O + O_2$
Glutathiona peroxidase (GPx)	GPx remove o H_2O_2 e peróxidos orgânicos (LOOH) para seus álcoois correspondentes (LOH) pelo acoplamento de sua redução a H_2O com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH).	c) $LOOH + 2GSH \xrightleftharpoons{GPx} GSSG + H_2O + LOH$

Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2007.

1.4.1 L-Carnitina

A L-carnitina [L-3-hidroxi-4-N,N,N-trimetilaminobutirato] (L-Car) (Figura 4) é uma amina quaternária altamente polar e hidrofílica, presente nos mamíferos na forma de L-Car livre, que corresponde aproximadamente 80 a 85%, acetil-carnitina e outros ésteres de carnitina. Cerca de 75% desse composto encontrado no homem é de origem exógena (oriunda de alimentos como carnes, ovos, peixes e leite), sendo o restante proveniente a partir da biossíntese endógena através dos aminoácidos precursores, lisina e metionina (Walter, 1996; Hoppel, 2003).

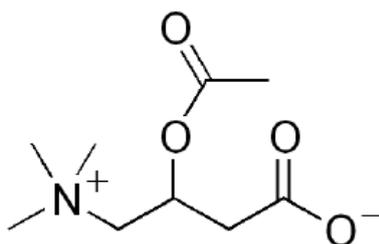


Figura 4. Estrutura química da L-Car (adaptado de Evans e Fornasini, 2003).

A L-Car desempenha um importante papel no metabolismo energético, principalmente por facilitar o transporte mitocondrial de ácidos graxos de cadeia longa para a β -oxidação e posterior síntese de energia a partir de ATP (Agarwal e Said, 2004; Mescka et al., 2016). Além disso, diversos estudos têm demonstrado que L-Car desempenha um papel de proteção contra o dano oxidativo, atuando como antioxidante e antirradicais, esse papel é resultado principalmente do sequestro de radicais hidroxila (efeito “scavenger”) e a inibição da formação destes radicais na reação de Fenton (Gülçin, 2006; Lee et al., 2014).

Devido a sua interação em diversos mecanismos bioenergéticos, a L-Car assume um papel importante em doenças relacionadas com o comprometimento metabólico, tendo sido estudada em alguns EIM. Nesse contexto, Mescka e colaboradores demonstraram que pacientes MSUD possuem deficiência de L-Car e que após dois meses de suplementação (50mg/kg/dia) houve o reestabelecimento desses níveis a valores normais, assim como uma diminuição dos valores de lipoperoxidação no plasma dos pacientes suplementados com este composto, um aumento nos níveis de di-tirosina e da capacidade antioxidante urinária (Mescka et al., 2013; Mescka et al., 2015a). Sitta et al. (2009), sugeriram que o estresse oxidativo em pacientes fenilcetonúricos tratados com dieta restrita em proteínas pode estar associado ao decréscimo nas concentrações de L-Car nos mesmos, sendo portanto, importante a suplementação dietética deste composto. Da mesma forma, foram verificados efeitos benéficos do tratamento com L-Car sobre o dano a lipídios, a proteínas e ao DNA em pacientes com desordens do metabolismo do propionato e nas acidemias D-2-hidroxiglutarica e L-2-hidroxiglutarica (Ribas et al., 2010a,b; Rodrigues et al, 2017) . Além disso, verificou-se pela técnica de ensaio cometa *in vitro* que a L-Car nas concentrações de 90, 120 e 150 μ M foi capaz de

diminuir as lesões causadas ao DNA pela Leu e seu α -cetoácido correspondente, o KIC (Mescka et al., 2014).

Também tem sido atribuído à L-Car papel na melhoria das funções imunológicas como inflamação, uma vez que foi observado uma diminuição na síntese de citocinas pró-inflamatórias em pacientes MSUD, e além disso tem apresentado um potencial efeito benéfico em diversas desordens neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (Tastekin et al., 2007; Mescka et al., 2015b).

1.5 Estresse oxidativo

Em organismos saudáveis, a produção de espécies reativas é em sua maior parte balanceada pelos sistemas de defesa antioxidante do organismo. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio do sistema antioxidante e as espécies reativas formadas (pró-oxidante), em favor destas, favorecendo com isso a ocorrência de estresse oxidativo (Figura 5) (Halliwell, 2006; (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar de uma diminuição das defesas antioxidantes e/ou da produção aumentada de oxidantes, gerando assim um acúmulo das espécies reativas que causam danos à estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios e proteínas. Quando a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade de defesa, as células podem sofrer adaptação por *up regulation*, injúria celular e morte por apoptose ou necrose (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Todos os tecidos estão expostos ao dano oxidativo. No entanto, o cérebro é um órgão extremamente suscetível a este tipo de lesão, devido ao seu baixo conteúdo de defesas antioxidantes, a grande quantidade de lipídeos poliinsaturados, ao alto consumo de oxigênio (já que utiliza uma grande quantidade de O_2 em uma massa relativamente pequena) e ao alto conteúdo de ferro que favorecem a lipoperoxidação em algumas áreas particulares (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Evidências sugerem que o estresse oxidativo tem um papel importante na fisiopatologia de muitas doenças humanas e tem sido relacionado à patogênese de diversas desordens neurodegenerativas, como doença de Parkinson, Huntington e

Alzheimer, epilepsia, esclerose lateral amiotrófica, entre outras (Reznick e Packer, 1993; Maxwell, 1995; Delanty e Dichter, 1998). Além disso, diversos estudos já demonstraram que o estresse oxidativo está aumentado em EIM, como nas acidemias orgânicas (Latini et al., 2005; Dos Santos Mello et al., 2015; Rodrigues et al., 2017) e aminoacidopatias (Streck et al., 2003; Sitta et al., 2011; Faverzani et al., 2017) dentre outras, sugerindo que haja uma relação com os danos cerebrais observados em pacientes com EIM, seja pelo acúmulo de metabólitos tóxicos e/ou pelas dietas restritas a que estes pacientes são submetidos, comprometendo consequentemente o *status* antioxidante (Sierra et al., 1988).

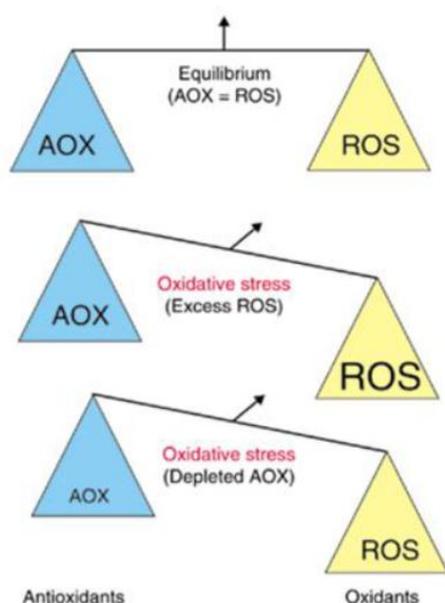


Figura 5. Estresse oxidativo. O desequilíbrio do sistema antioxidante/pró-oxidante, representado pelos antioxidantes (AOX) e espécies reativas do oxigênio (ERO – Reactive Oxygen Spécies – “ROS”) (Adaptado de Scandalios, 2002).

1.5.1 Dano ao DNA

O DNA é particularmente suscetível à oxidação, com consequentes quebras em sua estrutura (simples ou duplas), danos álcali-lábeis, crosslinks e quebras resultantes de reparo por excisão (Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim como as defesas antioxidantes, os sistemas biológicos possuem mecanismos importantes de reparo para proteger o DNA e garantir a integridade do genoma (Jacson e Bartek, 2009). Dessa forma, o dano ao ácido nucléico não reparado pode ter consequências relevantes no genoma como mutações, perda de heterozigidade, instabilidade de

microssatélites, aberrações cromossômicas, citotoxicidade e crescimento neoplásico, na qual a causa pode ser devida a mecanismos diretos ao DNA ou pela ativação de endonucleases de Ca^{2+} dependentes e interação com enzimas de replicação e reparo de DNA (Cooke et al., 2006, Moraes et al., 2012). O $\text{OH}\bullet$, o mais reativo entre as ERO, é gerado pela reação de H_2O_2 com metais de transição ferro e cobre, sendo conhecido por reagir com todas as biomoléculas e com todos os componentes da molécula do DNA, danificando bases purínicas, pirimídicas e o esqueleto de desoxirribose (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O dano ao DNA pode ser medido através de uma técnica conhecida por ensaio cometa alcalino a qual foi descrita por Singh et al. (1988). Em comparação a outras técnicas, o teste do cometa é amplamente utilizado, de fácil execução e com alta sensibilidade para detectar baixos níveis de lesão de DNA. Essa técnica consiste em medir o dano resultante da fragmentação do DNA, e estes fragmentos migram para fora do núcleo formando uma espécie de “cauda de cometa”, que é proporcional ao dano. As células serão classificadas visualmente em quatro classes, de acordo com o tamanho da cauda (tamanho 0- sem dano ao tamanho 4- dano máximo) (Collins, 2014; Liao et al., 2009).

Apesar da sensibilidade da técnica, a mesma não é capaz de discriminar a origem do dano ao DNA. Portanto, o dano oxidativo ao DNA pode ser determinado através da medição dos níveis urinários da 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), produto da oxidação da base purínica guanosina (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O dano ao DNA já foi observado em diversas patologias que afetam o sistema nervoso, como na doença de Parkinson e Alzheimer, bem como em alguns EIM, inclusive na MSUD (Filippon et al., 2011; Negretto et al., 2014; Mescka et al., 2014; Sanders et al., 2014; Marchetti et al., 2015; Biancini et al., 2017).

1.6 Estresse oxidativo e Doença da Urina do Xarope do Bordo

Foi demonstrado *in vitro*, que tanto os BCAAs como seus respectivos α -cetoácidos, foram capazes de estimular a lipoperoxidação em homogeneizados de cérebro de ratos (Fontella et al., 2002; Bridi et al., 2003). Principalmente a Leu e o KIC, reduziram a capacidade do cérebro em modular o dano relacionado ao aumento de radicais livres e a lipoperoxidação pode ser atenuada por antioxidantes

como glutathione reduzida, vitaminas C e E e superóxido dismutase (Bridi et al., 2003; Bridi et al., 2005a, b).

Evidências sugerem ainda, que pacientes MSUD tratados por uma fórmula hipoproteica e semissintética de aminoácidos, apresentam uma redução nas defesas antioxidantes devido à deficiência de micronutrientes essenciais, como vitaminas e minerais (Barschak et al., 2006; Sitta et al., 2014).

Neste contexto, Mescka e colaboradores (2013) demonstraram que pacientes MSUD submetidos à restrição dietética apresentam deficiência de L-Car. Além disso, em um modelo de indução química da MSUD observaram que os BCAAs diminuem as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, aumentam a peroxidação lipídica e protéica em córtex cerebral de ratos jovens (Mescka et al., 2016).

Verificou-se um aumento significativo de lipoperoxidação em plasma de pacientes com MSUD (Barschak et al., 2006; Barschak et al., 2008). Este mesmo grupo de pesquisa estudou os níveis de selênio no plasma de pacientes com MSUD antes e durante o tratamento dietético, bem como a atividade de enzimas antioxidantes em eritrócitos nestes pacientes. Foi verificado que os pacientes com MSUD apresentam uma deficiência moderada de selênio no momento do diagnóstico da doença e que esta deficiência se agrava com o tratamento dietético.

Foi observado também que a atividade da enzima GSH-Px está diminuída em eritrócitos de pacientes em tratamento (Barschak et al., 2007). Além disso, Mescka e colaboradores recentemente avaliaram o perfil inflamatório dos pacientes MSUD em tratamento dietético, onde foi verificado uma correlação positiva entre as concentrações de interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL- γ) e os níveis de malondialdeídos (MDA), um indicador de lipoperoxidação e uma correlação negativa com as concentrações de L-Car (Mescka et al., 2015b).

Desse modo, é possível que o acúmulo de metabólitos tóxicos induza a formação excessiva de radicais livres. Além disso, é provável que a deficiência de selênio, L-Car, a concomitante diminuição da atividade da enzima glutathione peroxidase e um aumento da demanda antioxidante em função da ativação de células imunocompetentes, como em pacientes com doenças inflamatórias, podem estar associados ao desenvolvimento do estresse oxidativo na MSUD. Neste contexto, faz-se necessário o estudo do possível efeito protetor de antioxidantes na

MSUD, bem como da investigação da indução de dano à biomoléculas pelos diversos metabólitos acumulados na doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Considerando que os mecanismos envolvidos no dano neurológico apresentado pelos pacientes com MSUD ainda não estão totalmente esclarecidos e que estudos anteriores indicam o envolvimento do estresse oxidativo como mecanismo neurotóxico na doença, o objetivo geral do trabalho foi verificar o dano oxidativo ao DNA induzido pela Allo e outros metabólitos acumulados na MSUD, assim como avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* da L-Car sobre o dano ao DNA, a fim de avaliar se a administração desse composto é capaz de proteger dos defeitos deletérios dos metabólitos acumulados na doença.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito *in vitro* da Allo e de cada aminoácido (Leu, Ile, Val) e α -cetoácido (KIC, KMV, KIV) acumulado na MSUD sobre o dano ao DNA em leucócitos periféricos humanos;
- b) Avaliar o efeito *in vitro* em leucócitos periféricos humanos sobre o dano ao DNA pela indução concomitante de todos os metabólitos acumulados na doença;
- c) Avaliar o efeito *in vitro* da L-Car em diferentes concentrações sobre o dano ao DNA induzido pelos metabólitos acumulados na MSUD em leucócitos periféricos humanos;
- d) Avaliar *in vivo* o dano oxidativo ao DNA, através da determinação da 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), em urina de pacientes com MSUD sob dieta de restrição proteica e suplementados ou não com L-Car por um período de dois meses;
- e) Correlacionar os níveis urinários de Leu e 8-OHdG *in vivo*.

3. RESULTADOS

3.1 CAPÍTULO 1- ARTIGO 1: DNA damage induced by alloisoleucine and other metabolites in maple syrup urine disease and protective effect of L-carnitine

*O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 53 – 61, foi suprimido por tratar-se de manuscrito publicado no periódico **Toxicology in Vitro**, tendo em vista que a Editora Sherpa-Romeo não autoriza o armazenamento da versão final do editor.*

4. DISCUSSÃO

A MSUD é um erro congênito do metabolismo dos aminoácidos causado por uma deficiência severa na atividade da enzima mitocondrial desidrogenase dos α -cetoácidos de cadeia ramificada (Chuang e Shinh, 2001).

Pacientes MSUD sob uma dieta normal e/ou durante episódios com aumento do catabolismo proteico são caracterizados bioquimicamente por um acúmulo nos tecidos e fluídos biológicos dos aminoácidos de cadeia ramificada Leu, Val, Ile e o isômero patognomônico Allo, bem como de seus correspondentes α -cetoácidos de cadeia ramificada KIC, KIV e KMV e, em menor extensão, de seus derivados hidroxilados. A elevada concentração destes metabólitos pode resultar em manifestações clínicas variáveis, porém é sabido relacionar-se com o dano neurológico progressivo, podendo levar ao óbito nos primeiros dias de vida (Chuang e Shinh, 2001; Schönberger et al., 2004). A instalação dos sintomas neurológicos pode ser prevenida devido à possibilidade de um diagnóstico e tratamento precoce iniciado logo após o nascimento. O tratamento baseia-se, principalmente através de uma dieta restrita em BCAAs, suplementada com aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais, além de um manejo terapêutico adequado, especialmente durante episódios de descompensação metabólica aguda (Chuang e Shih, 2001).

Apesar de o comprometimento neurológico ser comum nesta doença, os mecanismos patogênicos responsáveis pela neurotoxicidade, aguda e em longo prazo, apresentados pelos pacientes MSUD ainda permanecem incertos. No entanto, estudos têm demonstrado que altas concentrações dos BCAAs e dos BCKAs causam comprometimento do metabolismo energético pela inibição da cadeia de transporte de elétrons (Sgaravatti et al., 2003; Ribeiro et al., 2008; Amaral et al., 2010) e atividade da creatina quinase no cérebro de ratos (Pilla et al., 2003), provocam apoptose neuronal (Jouvet et al., 2000; Funchal et al., 2002; Funchal et al., 2004), convulsões (Coitinho et al., 2001), causam mielinização prejudicada (Treacy et al., 1992; Tribble e Shapira, 1983; Taketomi et al., 1983; Schönberger, 2004) e redução na captação de aminoácidos essenciais pelo cérebro (Araújo et al., 2001) levando a diminuição na síntese e função de neurotransmissores (Zielke et al., 1997; Tavares et al., 2000; Zinnanti et al., 2009). Outros pesquisadores demonstraram que esses metabólitos induzem alterações no sistema colinérgico (Scaini et al., 2012b), em níveis de neurotrofina, como o fator neurotrófico derivado

do cérebro e o fator de crescimento neural (Scaini et al., 2013a,b, 2015) e nas proteases lisossomais (Scaini et al., 2016).

Ultimamente, evidências crescentes têm mostrado que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatologia do dano neurológico encontrado na MSUD, uma vez que estudos vêm indicando a relação do acúmulo de metabólitos com uma produção excessiva de radicais livres e/ou pela diminuição da capacidade antioxidante tecidual (Barschak et al., 2007; Barschak et al., 2008b; Frazier et al., 2014).

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente instáveis que quando em excesso apresentam potencial de induzir dano a várias biomoléculas, provocando uma perturbação no equilíbrio redox (Maxwell, 1995; Halliwell e Gutteridge, 2007). Por sua vez, o cérebro é um órgão extremamente suscetível ao estresse oxidativo, devido ao seu elevado consumo de oxigênio por unidade de massa de tecido, presença de neurotransmissores auto-oxidáveis (dopamina e noradrenalina), elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas neuronais e concentrações de ferro, além de níveis relativamente baixos de defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Fontella e colaboradores (2002) em um estudo *in vitro* em homogeneizados cerebrais de ratos jovens mostraram que os BCAAs e seus respectivos BCKAs aumentaram significativamente a quimiluminescência, que é a emissão de luz espontânea principalmente por lipídeos peroxidados devido ao aumento na produção de espécies ativas de oxigênio ou de nitrogênio e também aumentaram significativamente a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), que reflete a formação de malondialdeído, um produto final da peroxidação de ácidos graxos de membrana (Halliwell e Gutteridge, 2007). Mais tarde Bridi e colaboradores (2003, 2005a,b) demonstraram que estes compostos, não só estimulam a lipoperoxidação *in vitro*, mas também reduzem a capacidade cerebral de modular eficientemente o dano associado com o aumento da produção de radicais livres. Adicionalmente, Mescka e colaboradores (2011) demonstraram que ratos Wistar submetidos ao modelo crônico de MSUD apresentaram peroxidação lipídica e dano a proteína. Observaram também uma diminuição na atividade das enzimas GPx e CAT em córtex cerebral de ratos.

Além disso, Wajner e colaboradores (2004) sugeriram que o tratamento dietético com restrição proteica ao qual os pacientes são submetidos pode levar a uma deficiência nutricional grave e ao comprometimento do sistema de defesa antioxidante. De fato, Barschak e colaboradores (2006) demonstraram em pacientes MSUD não tratados um aumento no dano oxidativo a lipídios, bem como uma diminuição da reatividade antioxidante total do plasma, sugerindo uma má qualidade dos antioxidantes teciduais para modular eficientemente os danos associados a uma produção aumentada de espécies reativas. Resultados semelhantes foram encontrados por estes autores no plasma de pacientes MSUD tratados com uma dieta restrita em proteínas e suplementados com uma fórmula semi-sintética de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. Esses pacientes apresentaram aumento da peroxidação lipídica, bem como redução das defesas antioxidantes, mesmo durante o tratamento (Barschak et al., 2008). Além disso, em 2009, Barschak e colaboradores mostraram que os níveis de triptofano e metionina apresentaram uma correlação negativa com os níveis de TBARS, sugerindo que o baixo conteúdo desses aminoácidos no plasma poderia possivelmente estar envolvido na peroxidação lipídica observada. Outros estudos demonstraram que pacientes MSUD possuem uma deficiência moderada de selênio, micronutriente essencial para a atividade da enzima glutathione peroxidase, e mais recentemente verificaram deficiência de L-Car (Barschak et al., 2007; Mescka et al., 2013). Estas deficiências nutricionais também foram observadas em pacientes fenilcetonúricos submetidos à dieta de restrição proteica (Sitta et al., 2009; Sitta et al., 2014).

A L-Car é um composto derivado quase exclusivamente de fontes alimentares (principalmente carnes, ovos, peixes e leite), amplamente conhecido por sua ação no metabolismo energético (Gülçin, 2006). Por outro lado, numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado um interessante papel antioxidante e anti-inflamatório em diversas patologias, incluindo desordens neurometabólicas e neurodegenerativas (Gülçin, 2006; Ribas et al. 2014; Mescka et al. 2015b). Neste contexto, Mescka e colaboradores (2011) mostraram que a L-Car preveniu a lipoperoxidação, o dano a proteínas e alterações na atividade da catalase e glutathione peroxidase em córtex de ratos em um modelo quimicamente induzido de MSUD. Corroborando com este estudo, a suplementação com 50 mg/Kg/dia de L-Car em pacientes sob tratamento com dieta hipoproteica foi capaz de reduzir a

lipoperoxidação plasmática e o índice de dano ao DNA, alvo particularmente relevante para a oxidação (Mescka et al., 2015b).

Sabe-se que radicais livres podem causar dano ao DNA por interação com metais de transição gerando uma variedade de lesões, incluindo quebras de cadeias de DNA, sítios abásicos, várias espécies de purinas/pirimidinas oxidadas e ligações cruzadas DNA-proteína (Wajner et al., 2004; Halliwell e Gutteridge, 2007). Além disso, Strand e colaboradores (2014) observaram em fibroblastos de pacientes MSUD o acúmulo de danos no DNA mitocondrial (mtDNA) e no DNA nuclear. O mtDNA, é mais sensível ao ataque de espécies reativas em relação ao DNA nuclear, visto que está mais próximo da formação de EROs decorrente da cadeia transportadora de elétrons e também porque não possui histonas protetoras (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Uma vez já evidenciado o aumento do dano ao DNA em pacientes MSUD e a sua relevância patológica, estudos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que os metabólitos acumulados na doença Leu e KIC podem induzir dano ao DNA *in vitro* em leucócitos, o qual foi prevenido pela co-incubação de L-Car (Mescka et al., 2014). No entanto, até o desenvolvimento do presente trabalho, não há relatos sobre danos ao DNA provocados pela Allo, um biomarcador patológico específico da MSUD, e pelos outros aminoácidos e α -cetoácidos acumulados na doença.

Assim, neste trabalho, objetivamos complementar as investigações, avaliando se Allo e os outros metabólitos acumulados na doença poderiam induzir danos *in vitro* ao DNA, determinados pelo ensaio cometa, bem como a influência da L-Car no dano ao DNA provocado por esses metabólitos.

O ensaio cometa é amplamente utilizado por ser uma técnica simples, rápida, de baixo custo e, com alta sensibilidade para detectar baixos níveis de lesão ao DNA (Liao et al., 2009; Collins, 2014). A técnica permite avaliar dano ao DNA em células individuais sob condições alcalinas ($\text{pH} > 13$) na qual ocorre desnaturação do DNA onde é possível avaliar quebra de fita simples e dupla e sítios álcali-lábeis (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). No estudo *in vitro*, os leucócitos humanos isolados após incubação com os metabólitos, são misturados a agarose e espalhados sobre uma lâmina de vidro pré-revestida com agarose e submetidos à eletroforese. Dessa forma ocorre migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebra, para

fora do núcleo. Após a eletroforese, as células são coradas e posteriormente analisadas em microscópio óptico. A análise é feita contando-se 100 leucócitos da amostra biológica, e cada célula é classificada por um escore que varia de 0 (sem migração) à 4 (migração máxima) de acordo com a intensidade da cauda (Burlinson et al., 2007; Tice et al., 2000).

Inicialmente, incubamos leucócitos de indivíduos saudáveis com concentrações de aminoácidos e α -cetoácidos que englobassem desde valores observados em sangue de pacientes MSUD bem tratados, até níveis mais elevados, encontrados no diagnóstico e/ou durante crises de descompensação metabólica aguda (Barschak et al., 2009). Os resultados do ensaio cometa mostraram que as duas concentrações testadas de cada aminoácido e α -cetoácido aumentaram significativamente, *in vitro*, os níveis de migração de DNA/dano ao DNA, quando comparados ao grupo controle. Embora os perfis de dano no DNA tenham sido bastante semelhantes, o índice de dano induzido pela Allo, Leu e KIC parece ter maior intensidade de lesão ao DNA que o induzido pelos outros metabólitos quando comparado ao grupo controle. Esses achados estão de acordo com o estudo anterior *in vitro* de Mescka e colaboradores (2014) onde verificaram que o aminoácido Leu e seu α -cetoácido KIC, são capazes de causar dano ao DNA, e com uma tendência maior de indução de dano ao DNA pela Leu. Outro trabalho recente demonstrou lesões ao DNA em hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos tanto uma hora quanto 15 dias após a administração intracerebroventricular do α -cetoácido KIC (Taschetto et al., 2017). De fato, sabe-se que a elevada concentração plasmática de Leu e do KIC, os metabólitos que mais se acumulam nesta desordem, está associado com o aparecimento dos sintomas neurológicos severos (Chuang e Shih, 2001).

Quando analisada a classe de dano ao DNA induzida pelos metabólitos, a Leu (500, 2500 μ M), Val (800 μ M) KIC (150, 1200 μ M), KIV (25 μ M) e KMV (100, 300 μ M) apresentaram um aumento homogeneamente distribuído de células danificadas com classes de dano 1 e 2. Já, os metabólitos Ile (75, 135 μ M), Allo (250, 700 μ M), Val (500 μ M) e KIV (50 μ M) apresentaram, curiosamente, células altamente danificadas com classe de dano 3, o que não foi observado no grupo controle. Embora não haja relatos sobre o efeito da Allo (DI = $50,2 \pm 1,5$ e $51,2 \pm 1,5$ para Allo 75 μ M e 135 μ M, respectivamente) no dano ao DNA, verificamos que este

aminoácido induziu um índice de dano semelhante ao da Leu (DI = $55 \pm 0,8$ e $59,7 \pm 1,2$ para Leu 500 μM e 2500 μM , respectivamente), porém induziu um número total de 12 células danificadas com classe de dano 3, não encontrado em todas as outras concentrações de BCAAs e BCKAs estudadas, podendo provavelmente interferir de forma importante no desequilíbrio redox do organismo. A Allo é um metabólito formado a partir da racemização da Ile, sendo indetectável no plasma de indivíduos saudáveis devido à interferentes e à sua baixa concentração. Os níveis de Allo encontrados no plasma de pacientes MSUD são menores em relação à Ile e os outros metabólitos, porém deve se levar em consideração que este metabólito tem uma depuração retardada e níveis elevados persistem no plasma durante vários dias após um episódio de descompensação metabólica, mesmo quando as concentrações de Ile são baixas. Além disso, é detectado em pacientes MSUD clássicos em todos os momentos (Chuang e Shih, 2001).

Ainda, demonstramos nesse estudo que quando incubamos juntos todos os aminoácidos e os α -cetoácidos nas concentrações mais baixas (valores de pacientes bem tratados) e naquelas mais altas (valores de diagnóstico e/ou nas crises de descompensação metabólica), ambos os grupos de concentração estudada foram capazes de aumentar significativamente, *in vitro*, os índices de dano ao DNA em leucócitos periféricos humanos, em relação ao grupo controle. Embora, o grupo com concentrações semelhantes às alcançadas no diagnóstico e em crises de descompensação metabólica, apresentou um maior índice de dano, deve-se enfatizar que, mesmo em concentrações similares encontradas no sangue de pacientes MSUD com boa adesão terapêutica, verificou-se níveis significativamente altos de dano ao DNA. Resultados semelhantes foram observados no ensaio cometa *in vitro*, onde a Leu plasmática mesmo em níveis aceitáveis clinicamente (100 a 300 μM) já apresentava maiores danos ao DNA em comparação a indivíduos controles (Mescka et al., 2014). Cabe salientar que o grupo que inclui os metabólitos em maior concentração induziu um índice de dano ao DNA de $69,5 \pm 0,6$, maior do que qualquer dos outros metabólitos isolados ou em conjunto, sugerindo um efeito sinérgico que pode ocorrer no diagnóstico e nas crises agudas dos pacientes MSUD.

Em relação à classe de dano em ambos os grupos de concentrações testadas (A e B), é possível verificar um maior número de células com classe de dano 3 (grupo A: 16 e grupo B: 24) e 4 (grupo A: 6 e grupo B: 8), o que não foi encontrado

no grupo controle, nem mesmo em nenhum outro aminoácido e α -cetoácido testados isoladamente. É importante notar que a classe de dano 4 foi induzida apenas quando os BCAAs e BCKAs foram analisados em conjunto, além de apresentar um número muito maior de células danificadas com classe de dano 3, sugerindo de fato um efeito sinérgico. Corroborando com nossos resultados, foi observado em pacientes MSUD tratados com dieta de restrição proteica um índice de dano ao DNA estatisticamente elevado comparado ao grupo controle, no qual foi observado células com classe de dano 3 e 4 (Mescka et al., 2015a). Além disso, Scaini e colaboradores (2012) verificaram aumento no dano ao DNA no hipocampo e estriado de ratos submetidos a um modelo quimicamente induzido de MSUD, que foi prevenido por uma terapia antioxidante com N-acetilcisteína mais deferoxamina. Esses achados reforçam a hipótese de que os metabólitos acumulados na doença, provavelmente sejam responsáveis, pelo menos em parte, pelo dano ao DNA observado em pacientes MSUD.

Ainda, após investigar a capacidade dos aminoácidos e α -cetoácidos de induzirem dano ao DNA, testou-se *in vitro* o efeito da L-Car (60 μ M e 120 μ M) sobre este dano. As concentrações de L-Car foram baseadas em resultados prévios obtidos para pacientes com MSUD, onde os níveis plasmáticos desse composto variam de 30 μ M ao diagnóstico, a quase 100 μ M sob suplementação de L-Car (Mescka et al., 2013). Sabe-se que a dose de L-Car 30 μ M não provoca alterações significativas nos índices de dano ao DNA (Mescka et al., 2014). Neste estudo, verificou-se que a concentração de L-Car 120 μ M foi capaz de atenuar parcialmente o índice de dano ao DNA induzido pelas duas concentrações de cada metabólito testado. Entretanto, para todos os α -cetoácidos nas duas concentrações estudadas, o efeito protetor da L-Car iniciou com a dose de 60 μ M, demonstrando que o α -cetoácido parece ser menos tóxico do que os aminoácidos no que se refere ao dano ao DNA. Da mesma forma, o efeito *in vitro* de L-Car 120 μ M sobre o dano ao DNA pela indução concomitante de todos os metabólitos, mostrou uma diminuição significativa em comparação com 60 μ M de L-Car, bem como com o grupo controle. Curiosamente, o número de células danificadas diminuiu com o tratamento para as classes de danos 1 e 2 (dados não mostrados), estando de acordo com os resultados encontrados em pacientes MSUD suplementados com L-Car (Mescka et al., 2015a)

O ensaio cometa não é capaz de discriminar a etiologia do dano ao DNA. Os radicais livres (especialmente o radical hidroxila) podem atacar o RNA e DNA nuclear e mitocondrial gerando três metabólitos de oxidação de guanina, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (da oxidação do DNA), 8-hidroxi-guanosina (da oxidação do RNA) e 8-hidroxi-guanina (da oxidação de ambos, DNA e RNA). Comumente, apenas a 8-OHdG é usada como marcador de dano oxidativo ao DNA, um produto da oxidação da base purínica guanosina (Halliwell e Guttridge, 2007). O DNA oxidado é continuamente reparado e as espécies de guanina oxidadas são liberadas na urina, indicando dano oxidativo ao DNA (Cooke et al., 2003). Assim, para melhor entender o mecanismo de dano ao DNA, também medimos os níveis de 8-OHdG em pacientes MSUD sob terapia com restrição protéica e após 1 e 2 meses de suplementação com L-Car. Nós verificamos um aumento significativo nos níveis de 8-OHdG em amostras de urina de pacientes MSUD em comparação com o grupo controle, que por sua vez foram positivamente correlacionados com os níveis de Leu na urina (metabólito em maior concentração nesta doença). Além disso, foi observada uma excreção urinária diminuída de 8-OHdG em pacientes tratados após 1 e 2 meses de suplementação com L-Car, com níveis semelhantes ao grupo controle. Esses achados corroboram com nossos resultados observados *in vitro*, juntamente com o estudo de Mescka e colaboradores (2013), onde verificaram uma correlação negativa significativa entre os níveis de MDA e as concentrações de L-Car livre em pacientes MSUD. Nossos resultados em pacientes evidenciam que o mecanismo de dano ao DNA é de origem oxidativa e que a L-Car confere importante proteção antioxidante neste processo. Estudos apontam que a L-Car reduz o dano oxidativo ao DNA especialmente devido a sua ação como “scavenger” de ROS, capacidade de quelar metais de transição (capazes de catalisar as reações de Fenton/Haber-Weiss), além de impulsionar a fosforilação de proteínas envolvidas na síntese e processamento de ácidos nucleicos e por estimular mecanismos de reparo ao DNA (Gülçin 2006; Thangasamy et al., 2009).

O dano oxidativo ao DNA vem sendo associado com um vasto número de patologias que afetam o sistema nervoso, incluindo a doença de Parkinson e Alzheimer (Filippon et al., 2011; Negretto et al., 2014, Sanders et al., 2014; Marchetti et al., 2015; Biancini et al., 2017), além de alguns EIM. Neste contexto, foi observado que pacientes fenilcetonúricos apresentam altas concentrações urinárias de 8-

OHdG. Além disso, foi verificada uma correlação significativa positiva entre os níveis de 8-OHdG e o metabólito fenilalanina acumulado na doença, e uma correlação negativa com a concentração sanguínea de L-Car (Deon et al., 2015). Ainda, corroborando e reforçando o envolvimento do dano oxidativo ao DNA em EIM, amostras de urina de pacientes com acidemia L-2-hidroxi-glutárica apresentaram aumento significativo de espécies de guanina oxidadas. Por outro lado, no estudo *in vitro* a L-Car atenuou o dano ao DNA provocado pelos ácidos D-2-hidroxi-glutárico e L-2-hidroxi-glutárico (Rodrigues et al., 2017). Vale ressaltar que caso ocorra uma falha nos mecanismos celulares de reparo ao ácido nucléico, sérias consequências poderão ocorrer no genoma, incluindo indução de mutações ou crescimento neoplásico, perda de heterozigosidade, aberrações cromossômicas, citotoxicidade, e até morte celular (Cooke et al., 2006; Moraes et al., 2012).

Em suma, nossos resultados demonstram que todos os metabólitos acumulados na MSUD, incluindo a Allo, induzem dano oxidativo ao DNA. Além disso, verificamos que a L-Car tem um efeito protetor sobre este dano, o qual provavelmente se deva a sua ação detoxificante e antioxidante. Cabe salientar que um estudo a longo prazo com L-Car em pacientes MSUD no futuro permitirá melhor avaliar seu potencial terapêutico.

5. CONCLUSÃO

Os resultados desta dissertação permitiram concluir que:

- a) A Allo, os BCAAs e os BCKAs provocam dano *in vitro* ao DNA em leucócitos humanos;
- b) A ação sinérgica entre os metabólitos acumulados na MSUD potencializa o dano ao DNA induzido *in vitro* em leucócitos humanos;
- c) A L-Car tem capacidade de diminuir as lesões ao DNA *in vitro* em leucócitos humanos, causadas pelos metabólitos acumulados na MSUD;
- d) Pacientes MSUD apresentam dano oxidativo ao DNA, o qual foi atenuado após 1 e 2 meses de suplementação de L-Car (50 mg/kg/dia);
- e) Há correlação significativa positiva entre os níveis urinários da 8-OHdG, um biomarcador de dano oxidativo ao DNA, e a Leu em pacientes MSUD.

Nossos resultados demonstraram que os BCAAs e BCKAs acumulados na MSUD induzem dano ao DNA *in vitro*, bem como levam a potencialização do dano induzido pela ação sinérgica entre eles. Além disso, este trabalho demonstra, como primeira menção na literatura, que a Allo, um importante biomarcador na MSUD, induz dano ao DNA *in vitro*, e que o dano oxidativo ao DNA em pacientes MSUD é decorrente do aumento da produção de radicais livres. Nosso estudo evidencia que a L-Car pode atenuar a lesão ao DNA *in vivo* e *in vitro* induzida pelos vários metabólitos acumulados na MSUD, demonstrando que a L-Car tem um importante papel como um adjuvante à terapia de restrição proteica já preconizada, auxiliando os pacientes MSUD na prevenção de processos oxidativos potencialmente patológicos.

Pretendemos dar continuidade a esse trabalho, expandindo nossos resultados. Desta forma, são nossas perspectivas:

- Avaliar *in vitro* o dano oxidativo ao DNA através do ensaio cometa com as enzimas de reparo endonuclease III (ENDO III) e formamidopirimidina-DNA-glicosilase (FPG) em leucócitos;
- Dosar as concentrações plasmáticas da Allo em pacientes MSUD no momento do diagnóstico e durante o tratamento;
- Correlacionar às concentrações plasmáticas de Allo com o parâmetro indicativo de dano ao DNA e sobre outros parâmetros de estresse oxidativo e inflamação *in vitro* e *in vivo*;
- Realizar o estudo molecular da MSUD em pacientes com diagnóstico dessa doença. Identificar a mutação no gene BCKAD associada à MSUD nesses pacientes, correlacionando com marcadores de estresse oxidativo e níveis de Allo.
- Avaliar biomarcadores inflamatórios (IL-1 e IL-10) em sangue de pacientes MSUD tratados ou não com L-Car e correlacionar com biomarcadores de dano oxidativo e com os BCAAs e BCKAs.

7. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Carnitines and male infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 8, n. 4, p. 376-384, 2004.

AHMED, R.G. The physiological and biochemical effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. **Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences**, v. 15, n. 1, p. 31-42, 2005.

AMARAL, A.U. et al. Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. **Brain Research**, v. 1324, p. 75-84, 2010.

ARAÚJO, P. et al. Reduction of large neutral amino acid levels in plasma and brain of hyperleucinemic rats. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 6, p. 529-537, 2001.

BARIC, I.; FUMIC, K.; HOFFMANN, G.F. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. **Croatian Medical Journal**, v. 42, n. 4, p. 379-383, 2001.

BARSCHAK, A.G. et al. Amino acids levels and lipid peroxidation in maple syrup urine disease patients. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 462-466, 2009.

BARSCHAK, A.G. et al. Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma selenium concentration are reduced in maple syrup urine disease patients during treatment. **The International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 5, 335–338, 2007.

BARSCHAK, A.G. et al. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. **Metabolic Brain Disease**, v. 21, n.4, p. 279-286, 2006.

BARSCHAK, A.G. et al. Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 4-5, p. 317-324, 2008b.

BARSCHAK, A.G. et al. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. **Metabolic Brain Disease**, v. 23, n. 1, p. 71–80, 2008a.

BIANCINI, G.B. et al. Globotriaosylsphingosine induces oxidative DNA damage in cultured kidney cells. **Nephrology**, v. 22, n. 6. p. 490-493, 2017.

BREMER, H.J. et al. **Disturbances of amino acids metabolism: Clinical chemistry and diagnosis**. Munchen: Urban & Schwarzenberg, 1981.

BRIDI, R. et al. Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. **The International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 327–332, 2003.

BRIDI, R. et al. Alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease stimulate lipid peroxidation and reduce antioxidant defenses in cerebral cortex from young rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 20, n. 2, p. 155–167, 2005a.

BRIDI, R. et al. Evaluation of the mechanism involved in leucine-induced oxidative damage in cerebral cortex of young rats. **Free Radical Research**, v. 39, n. 1, p. 71–79, 2005b.

BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. **Mutation Research**, v. 627, n. 1, p. 31-35, 2007.

CHUANG, D.T.; CHUANG, J.L.; WYNN R.M. Branched-chain amino acids: metabolism, physiological function and application. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 243S-249S, 2006.

CHUANG, D.T.; SHIH, V.E. Maple syrup urine disease (branchedchain ketoaciduria). In: Scriver CR, Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. **Metabolic and molecular bases of inherited disease**, 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

CHUANG, D.T.; SHIH, V.E. Maple syrup urine disease: It has come a long way. **The Journal of Pediatrics**, v. 132, n. 3 Pt 2, p. S17-23, 1998.

COITINHO, A.S. et al. Pharmacological evidence that alpha-ketoisovaleric acid induces convulsions through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. **Brain Research**, v. 894, n. 1, p. 68-73, 2001.

COLLINS, A.R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1840, n. 2. p. 794-800, 2014.

COOKE. M.S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **FASEB Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195-214, 2003.

COOKE, M.S.; OLINSKI, R.; EVANS, M.D. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance?. **Clinica Chimica Acta**, v. 365, n. 1-2, p. 30-49, 2006.

DANCIS, J. et al. Maple Syrup Urine Disease. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5114, p. 91-93, 1959.

DANCIS, J.; HUTZLER, J.; LEVITZ, M. Metabolism of the white blood cells in maple-syrup-urine disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 43, p. 342-343, 1960.

DANNER, E. et al. Purification and characterization of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase from bovine liver mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 5522-5526, 1979.

DELANTY, M.; DICHTER, N.A. Oxidative injury in nervous system. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 98, n. 3, p. 145-153, 1998.

DEON, M. et al. Protective effect of L-carnitine on phenylalanine-induced DNA damage. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 4, p. 925-933, 2015.

DOS SANTOS MELLO, M. et al. Increased oxidative stress in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 402, n. 1-2, p. 149-155, 2015.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

EVANS, A.M.; FORNASINI, G. Pharmacokinetics of L-carnitine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, p. 941-967, 2003.

FAVERZANI, J.L. et al. Oxidative Stress in Homocystinuria Due to Cystathionine β -Synthase Deficiency: Findings in Patients and in Animal Models. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 37, n. 8, p. 1477-1485, 2017.

FEIER, F. et al. Living related versus deceased donor liver transplantation for maple syrup urine disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 117, n. 3, p. 336-343, 2016.

FILIPPON, L. et al. DNA damage in leukocytes from pretreatment mucopolysaccharidosis type II patients; protective effect of enzyme replacement therapy. **Mutation Research**, v. 721, n. 2, p. 206-210, 2011.

FONTELLA, F.U. et al. Stimulation of lipid peroxidation in vitro in rat brain by metabolites accumulating in maple syrup urine disease. **Metabolic Brain Disease**, v. 17, n. 1, p. 47-54, 2002.

FRAZIER, D.M. et al. Nutrition management guideline for maple syrup urine disease: An evidence- and consensus-based approach. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 112, n. 3, p. 210-217, 2014.

FUNCHAL, C. et al. Alpha-keto-beta-methylvaleric acid increases the in vitro phosphorylation of intermediate filaments in cerebral cortex of young rats through the gabaergic system. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 217, n. 1, p. 17-24, 2004.

FUNCHAL, C. et al. Alpha-ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediated filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. **Brain Research**, v. 139, n. 2, p. 267-276, 2002.

GIBSON, G.E.; BIASS, J.P. Inhibition of acetylcholine synthesis and of carbohydrate utilization by maple syrup urine disease metabolites. **Journal of Neurochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1073-1078, 1976.

GUERREIRO, G. et al. Urinary biomarkers of oxidative damage in Maple syrup urine disease: the L-carnitine role. **The International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 42, p. 10-4, 2015.

GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. **Life Sciences**, v. 78, n. 8, p. 803-811, 2006.

HALLIWELL, B. Antioxidant in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTERRIDGE, J. M.C. **Free Radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HERBER, S. et al. Maple syrup urine disease in Brazil: a panorama of the last two decades. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 3, p. 292-298, 2015.

HOFFMANN, G.F. Selective screening for inborn errors of metabolism: past, present and future. **European Journal of Pediatrics**, v. 153, n. 7 suppl 1, p. S2-8, 1994.

HOPPEL, C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabol. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 41, n. 4 Suppl 1, p. S4-12, 2003.

IMTIAZ, F. et al. Twenty novel mutations in BCKDHA, BCKDHB and DBT genes in a cohort of 52 Saudi Arabian patients with maple syrup urine disease. **Molecular Genetics Metabolism Reports**, v. 7, n. 11, p. 17-23, 2017.

JACKSON, S.P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-1078, 2009.

JIMENEZ-SANCHEZ, G.; CHILDS, B.; VALLE, D. The effect of Mendelian disease on human health. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.R.; Sly, W.; Valle, D. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8th. ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

JOUVET, P. et al. Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 5, p. 1919-1932, 2000.

LATINI, A. et al. Promotion of oxidative stress by 3-hydroxyglutaric acid in rat striatum. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 28, n. 1, p. 57-67, 2005.

LEE, B.J. et al. Effects of L-carnitine supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes activities in patients with coronary artery disease: a randomized, placebo-controlled trial. **Nutrition Journal**, v. 4, p. 13-79, 2014.

LEPAGE, N. et al. Age-specific distribution of plasma amino acid concentration in healthy pediatric population. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 2397-2402, 1997.

LIAO, W.; MCNUT, M.A.; ZHU, W.G. et al. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p. 46-53, 2009.

MARCHETTI, D.P. et al. Protective effect of antioxidants on DNA damage in leukocytes from X-linked adrenoleukodystrophy patients. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 43, p. 8-15, 2015.

MATUDA, S. et al. Pyruvate dehydrogenase subcomplex with lipoamide dehydrogenase deficiency in a patient with lactic acidosis and branched chain ketoaciduria. **Clinica Chimica Acta**, v. 140, n. 1, p. 59 – 64, 1984.

MAXWELL, R.J. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, v. 49, n. 3, p. 345-361, 1995.

MAZARIEGOS, G.V. et al. Liver transplantation for classical maple syrup urine disease: long-term follow-up in 37 patients and comparative United Network for Organ Sharing experience. **The Journal of Pediatrics**, v. 160, n. 1, p. 116-121, 2012.

MENKES, J.H.; HURST, P.L.; CRAIG, J.M. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. **Pediatrics**, v. 14, n. 5, p. 462-467, 1954.

MESCKA, C.P. et al. L-carnitine Prevents Oxidative Stress in the Brains of Rats Subjected to a Chemically Induced Chronic Model of MSUD. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 9, p. 6007-6017, 2016.

MESCKA, C.P. et al. Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 5, p. 1167-1174, 2015b.

MESCKA, C. et al. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. **Metabolic Brain Disease**, v. 26, n. 11, p. 21-28, 2011.

MESCKA, C.P. et al. L-Carnitine supplementation decreases DNA damage in treated MSUD patients. **Mutation Research**, v. 775, p. 43-47, 2015a.

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

MESCKA, C.P. et al. Protein and lipid damage in maple syrup urine disease patients: L-carnitine effect. **The International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 21–24, 2013.

MORAES, M.C.S.; NETO, J.B.C.; MENCK, C.F.M. DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, 17:1362-1388, 2012.

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

MUELLER, R.R.; YOUNG, I.D. Biochemical genetics. In: **Emery's Elements of Medical Genetics**. 9th. ed. New York: Churchill, 1995.

MUELLY, E.R. et al. Biochemical correlates of neuropsychiatric illness in maple syrup urine disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 4, p. 1809-20, 2013.

NEGRETTO, G.W. et al. In vitro effect of genistein on DNA damage in leukocytes from mucopolysaccharidosis IVA patients. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 111, n. 2, p. 205-208, 2014.

NELLIS, M.M.; DANNER, D.J. Gene preference in maple syrup urine disease. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 1, p. 232-237, 2001.

OGIER de BAULNY, H.; SAUDUBRAY, J.M. Branched-chain organic acidurias. **Seminars in Neonatology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2002.

PEINEMANN, F.; DANNER, D.J. Maple syrup urine disease 1954 to 1993. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 17, n. 1, p. 3-15, 1994.

PILLA, C. et al. Creatine kinase activity from rat brain is inhibited by branched-chain amino acids in vitro. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 5, p. 675-679, 2003.

PRENTKI, M.; RENOLD, A.E. Neural amino acid transport in isolated rat pancreatic islets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 23, p. 14239-14244, 1965.

QUENTAL, S. et al. Maple syrup urine disease due to a new large deletion at BCKDHA caused by non-homologous recombination. **Journal of Inherited Metabolism Disease**, v. 31, n. S2, p. 457-60, 2008b.

QUENTAL, S. et al. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 94, n. 2, p. 148-56, 2008a.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. **Free Radicals: from Basic Science to Medicine**, p. 425-437, 1993.

RIBAS, G.S. et al. Prevention by l-carnitine of DNA damage induced by propionic and l-methylmalonic acids in human peripheral leukocytes in vitro. **Mutation Research**, v. 702, n. 1, p. 123-128, 2010b.

RIBAS, G.S. et al. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 127-132, 2010a.

RIBAS, G.S.; VARGAS, C.R.; WAJNER, M. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. **Gene**, v. 533, n. 2, p. 469-476, 2014.

RIBEIRO, C.A. et al. Inhibition of Brain Energy Metabolism by the Branched-chain Amino Acids Accumulating in Maple Syrup Urine Disease. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 1, p. 114-124, 2008.

ROBINSON, B.H. et al. Lactic acidemia, neurologic deterioration and carbohydrate dependence in a girl with dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. **European Journal of Pediatrics**, v. 136, n. 1, p. 35 – 39, 1981.

RODRIGUES, D.G.B. et al. Experimental evidence of oxidative stress in patients with l-2-hydroxyglutaric aciduria and that l-carnitine attenuates in vitro DNA damage caused by d-2-hydroxyglutaric and l-2-hydroxyglutaric acids. **Toxicology In Vitro**, v. 42, p. 47-53, 2017.

SANDERS, L.H. Et al. Mitochondrial DNA damage: molecular marker of vulnerable nigral neurons in Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 70, p. 214-223, 2014.

SAUDUBRAY, J.M.; CHARPENTIER, C. Clinical phenotypes: diagnosis/algorithms. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. 8th. ed. New York: MCGraw-Hill, 2001.

SCAINI, G. et al. Acute Administration of Branched-Chain Amino Acids Increases the Pro-BDNF/Total-BDNF Ratio in the Rat Brain. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 5, p. 885-893, 2015.

SCAINI, G. et al. Acute and chronic administration of the branched-chain amino acids decrease nerve growth factor in rat hippocampus. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 3, p. 581-9, 2013a.

SCAINI, G. et al. Behavioral Responses in Rats Submitted to Chronic Administration of Branched-Chain Amino Acids. **JIMD Reports**, v. 13, p. 159–167, 2014.

SCAINI, G. et al. Chronic administration of branched-chain amino acids impairs spatial memory and increases brain-derived neurotrophic factor in a rat model. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 36, n. 5, p. 721-30, 2013b.

SCAINI, G. et al. DNA damage in an animal model of maple syrup urine disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 106, n. 2, p. 169-174, 2012.

SCAINI, G. et al. Evaluation of Acetylcholinesterase in an Animal Model of Maple Syrup Urine Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 45, n. 2, p. 279–286, 2012b.

SCAINI, G. et al. Serum Markers of Neurodegeneration in Maple Syrup Urine Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5709-5719, 2016.

SCANDALIOS, J.C. Oxidative stress responses - what have genome – scale studies taught us? **Genome Biology**, v. 3. n. 7, p. 1019.1-1019.6, 2002.

SCHADEWALDT, P. et al. On the mechanism of l-alloisoleucine formation: Studies on a healthy subject and in fibroblast from normal and patients with maple syrup urine disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 12, n. 2, p. 137-150, 1990.

SCHADEWALDT, P., WENDEL, U. Metabolismo of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. **European Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 1, p. S62-6, 1997.

SCHÖNBERGER, S. et al. Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 82, n. 1, p. 69-75, 2004.

SCRIVER, C. et al. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8th. ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

SGARAVATTI, A.M.; ROSA, R.B.; SCHUCK, P.F. Inhibition of brain energy metabolism by the α -keto acids accumulating in maple syrup urine disease. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1639, n. 3, p. 232-238, 2003.

SERRA, J.D.; SÁNCHEZ, F.A.; VISUS, F.S.V. "Enfermidades de orina de jarabe arce". In: Sanjurjo, P.; Baldellou, A. **Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias**, 3. ed. Madrid: Ediciones Ergon, 2010.

SIERRA, C. et al. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 276, n. 1, p. 1-9, 1998.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SIMON, E. et al. Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening of the neonatal course of the disease. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 29, n. 4, p. 532-537, 2006.

SITTA, A. et al. Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. **Mutation Research**, v. 679, n. 1-2, p. 13-16, 2009.

SITTA, A. et al. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 31, n. 3, p. 429-436, 2011.

SITTA, A. et al. Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 34, p. 2, p. 157-165, 2014.

SNYDERMAN, S.E.; NORTON, P.M.; ROITMAN, E. Maple syrup urine disease with particular reference to diet therapy. **Pediatrics**, v. 34, n. 4, p. 454-472, 1964.

SOUZA, C.F.M.; SCHWARTZ, I.V.; GIUGLIANI, R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 129-137, 2002.

SPERRINGER, J.E.; ADDINGTON, A.; HUTSON, S.M. Branched-Chain Amino Acids and Brain Metabolism. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 6, p. 1697-1709, 2017.

STRAND, J.M. et al. Genome instability in Maple Syrup Urine Disease correlates with impaired mitochondrial biogenesis. **Metabolism**, v. 63, n. 8, p. 1063-1070, 2014.

STRAUSS, K.A. et al. Classical maple syrup urine disease and brain development: principles of management and formula design. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 99, n. 4, p. 333- 345, 2010.

STRAUSS, KA. et al. Maple syrup urine disease. In: Bird, T.; Dolan, C.; Stephens, K.; Adam, M. **GeneReviews**. Seattle, Washington, USA: University of Washington, 2006.

STRECK, E.L. et al. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. **Metabolic Brain Disease**, v. 18, n. 2, p. 147-154, 2003.

TAKANO, C. et al. A case of classical maple syrup urine disease that was successfully managed by living donor liver transplantation. **Pediatric Transplantation**, v. 21, n. 5, 2017.

TAKETOMI, T. et al. Abnormal protein and lipid compositions of the cerebral myelin of a patient with maple syrup urine disease. **Journal of Experimental Medicine**, v. 53, n. 3, p. 109-116, 1983.

TASCHETTO, L. et al. Acute and long-term effects of intracerebroventricular administration of α -ketoisocaproic acid on oxidative stress parameters and cognitive and noncognitive behaviors. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 5, p. 1507-1518, 2017.

TASHIAN, R.E. Inhibition of brain glutamic acid decarboxylase by phenylalanine, valine, and leucine derivatives: a suggestion concerning the etiology of the neurological defect in phenylketonuria and branched-chain ketonuria. **Metabolism**, v. 10, p. 393-402, 1961.

TASTEKIN, N. et al. Protective effects of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant asthritis. **Pharmacological Research**, v. 56, n. 4, p. 303-310, 2007.

TAVARES, R.G. et al. Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles of rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease. **The Journal of the Neurological Sciences**, v. 181, n. 1-2, p. 44-49, 2000.

THANGASANG, T. et al. L-carnitine mediates protection against DNA damage in lymphocytes of aged rats. **Biogerontology**, v. 10, n. 2, p. 163-172, 2009.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.

TREACY, E. et al. Maple syrup urine disease: interrelationship between branched chain amino-oxo-and hidroxyacids implications for treatment association with CNS dysmyelination. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 15, n. 1, p. 121-135, 1992.

TRIBLE, D.; SHAPIRA, R. Myelin proteins degradation in rat brain initiated by metabolites causative of maple syrup urine disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 114, n. 2, p. 440-446, 1983.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

WAJNER, M. et al. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insight from animal studies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 27, n. 4, p. 427-448, 2004.

WAJNER, M. et al. Reduction of large neutral amino acid concentration in plasma and CSF of patients with maple syrup urine disease during crises. **The Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 23, n. 5, p. 505-512, 2000.

WALTER, J.H. L-carnitine. **Archives of Disease in Childhood**, v. 74, n. 6, p. 475-478, 1996.

WALTERFANG, M. et al. The neuropsychiatry of inborn errors of metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 36, n. 4. P. 687–702, 2013.

WENDEL, U.; BAULNY, HO. Branched-Chain Organic Acidurias/Acidemias. In: Fernandes, J.; Saudubray, J.M.; Berghe, G.V. **Inborn Metabolic diseases**. 3th. ed, 2006.

YUDKOFF, M. et al. Inhibition of astrocyte glutamine production by alpha ketoisocaproic acid. **Journal of Neurochemistry**, 63, n. 4, p. 1508-15, 1994.

ZABLOCKA, A.; JANUSZ, M. The two faces of reactive oxygen species. **Postepy higieny i medycyny doswiadczonej**, v. 26, p. 118-124, 2008.

ZIELKE, H.R. et al. Effect of alpha-ketoisocaproate and leucine on the in vivo oxidation of glutamate and glutamine in the rat brain. **Neurochemical Research**, v. 22, n. 9, p. 1159-1164, 1997.

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

8.1 ANEXO 1: SOLICITAÇÃO DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DIRIGIDA PARA PACIENTES:

Nome completo do Paciente:

Data de Nascimento: ____/____/____ (DD/MM/AAAA)

Sexo: () masc. () fem () obs.

Nome do médico solicitante:

Nome de outro médico ou pessoa para contato:

Serviço de origem:

Data da solicitação: ____/____/____ (DD/MM/AAAA)

Amostras Enviadas:

- () urina
- () plasma
- () sangue heparinizado
- () sangue em papel filtro
- () outra (descrever)

Exames Solicitados:

Motivo principal da solicitação:

Resumo da história clínica:

Sinais e sintomas selecionados:

- | | |
|-------------------------|-----------------|
| hepatomegalia | () não () sim |
| retardo de crescimento | () não () sim |
| retardo neuropsicomotor | () não () sim |
| deficit cognitivo | () não () sim |
| regressão neurológica | () não () sim |
| vômitos | () não () sim |
| dificuldade alimentação | () não () sim |
| dismorfias | () não () sim |
| convulsões | () não () sim |
| hipotonia | () não () sim |
| coma | () não () sim |
| macrocefalia | () não () sim |
| outro: | () não () sim |

Principais resultados de exames relevantes anteriores:

Dados laboratoriais selecionados:

hiperamonemia não sim:

hipoglicemia não sim:

acidose metabólica não sim

cetonúria não sim

acidemia láctica não sim

Neuroimagem:

tomografia computadorizada não sim

normal anormal

ressonância magnética não sim

normal anormal

Medicamentos em uso: não sim

Dieta especial? não sim

Consangüinidade entre os pais: não sim

Outros casos na família? não sim

Hipóteses diagnósticas:

Alguma informação relevante adicional?

8.2 ANEXO 2: FICHA DE DADOS DE INDIVÍDUOS CONTROLE

1. Data da coleta:

2. Nome completo:

3. Data de nascimento: ____/____/____ (DD/MM/AAAA)

4. Idade:

5. Sexo: () masc. () fem.

6. Motivo da solicitação do exame:

7. Apresenta doenças já diagnosticadas?

diabete melito () não () sim

hipotireoidismo () não () sim

hipertireoidismo () não () sim

hipertensão arterial sistêmica (HAS) () não () sim

acidente vascular cerebral (AVC) () não () sim

cardiopatia isquêmica () não () sim

insuficiência cardíaca () não () sim

insuficiência hepática () não () sim

insuficiência renal () não () sim

outras: _____

8. Está usando medicamento? () não () sim: _____

9. Doenças na família biológica:

dislipidemia () não () sim

hipertensão arterial sistêmica (HAS) () não () sim

cardiopatia isquêmica () não () sim

acidente vascular cerebral (AVC) () não () sim

diabete melito () não () sim

outra doença crônica: _____

10. Fuma? () não () sim

8.3 ANEXO 3: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PACIENTES MSUD

Projeto de Pesquisa: Dano oxidativo a biomoléculas induzido pela Aloisoleucina e outros metabólitos acumulados na Doença da Urina do Xarope do Bordo: Efeito da L-carnitina

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo realizado pelo Grupo de Pesquisa de Erros Inatos do Metabolismo e Estresse Oxidativo do Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). Sua participação neste projeto deve-se ao fato de você ser o adulto responsável legal por um paciente atendido pelo SGM-HCPA por ter altos níveis plasmáticos dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina. Esta característica está associada a uma doença genética chamada Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD). Esta doença é causada por alterações genéticas (mutações) que podem ser herdadas.

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar o efeito da substância L-carnitina sobre o estresse oxidativo (dano as células) encontrado em indivíduos com MSUD em comparação com indivíduos sem esta doença. Já é sabido que a L-carnitina em outras doenças pode corrigir e diminuir o estresse oxidativo e que essa substância é hoje utilizada para tratamento em diferentes situações clínicas. A participação nessa pesquisa é voluntária. Se você decidir participar, o paciente MSUD pelo qual você é responsável vai receber gratuitamente a suplementação de L-carnitina na dose 50 mg/kg/dia, não excedendo 1,5g/dia por 60 dias. Além da administração de L-carnitina, será coletado sangue periférico e urina em três momentos diferentes em frascos específicos (total de 10 ml, equivalente a duas colheres de chá) de cada fluido. A primeira coleta será realizada antes do início do tratamento, a segunda coleta após um mês de tratamento com L-carnitina e a terceira após dois meses. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de

urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o auxílio de profissionais treinados. Potenciais efeitos adversos relacionados à medicação são sintomas gastrointestinais como diarreia, cólicas ou vômitos, no entanto estes não são frequentes. Não são esperados casos de hipersensibilidade. Esta medicação é de livre comércio e aprovada por agências reguladoras nacionais e internacionais. Após o término do estudo os materiais biológicos (sangue periférico e urina) que ainda estiverem armazenados poderão ser descartados ou mantidos para futuras pesquisas dentro do mesmo objetivo deste estudo, de acordo com a sua decisão de autorizar o uso futuro. Se autorizado, o material somente será utilizado para novas pesquisas mediante seu consentimento por escrito.

Com relação ao uso dos materiais biológicos, ao final do estudo, você (marque com um X):

autoriza o armazenamento.

não autoriza o armazenamento, solicitando que sejam descartados.

Cabe salientar que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o tratamento e/ou acompanhamento médico do paciente no qual você é responsável. Este estudo pode, entretanto, contribuir no futuro, para um tratamento mais efetivo para os pacientes MSUD e melhor entendimento das consequências do estresse oxidativo.

É importante ressaltar também, que nem você nem a pessoa sob sua tutela receberão nenhum tipo pagamento pela participação no estudo e que todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio projeto de pesquisa, portanto, serão completamente gratuitas para você.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e o mestrande Tatiane Cristina Hauschild) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no Serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: (51) 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta-feira.

Este documento será elaborado em duas vias, sendo que uma delas (assinada por nós) será entregue a você, responsável legal pelo participante da pesquisa, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

“Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.”

Data: _____

Nome: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

8.4 ANEXO 4: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: INDIVÍDUOS CONTROLE

Projeto de Pesquisa: Dano oxidativo a biomoléculas induzido pela Aloisoleucina e outros metabólitos acumulados na Doença da Urina do Xarope do Bordo: Efeito da L-carnitina

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo realizado pelo Grupo de Pesquisa de Erros Inatos do Metabolismo e Estresse Oxidativo do Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA). Este projeto procura investigar uma doença genética chamada de Doença da Urina do Xarope do Bordo (MSUD), que tem por objetivo verificar o dano oxidativo a biomoléculas induzido pela aloisoleucina e outros metabólitos compostos na doença, ou seja, da ação dos radicais livres (moléculas encontradas normalmente em nosso organismo que quando em excesso podem ser nocivas), e o efeito da substância antioxidante, L-carnitina, sobre o dano ao DNA (pacientes MSUD possuem deficiência desse antioxidante, que pode ser capaz de diminuir a atuação dos radicais livres). Você está sendo convidado (a) a participar deste estudo como controle, ou seja, por não ser portador (a) de MSUD.

Para participar você fará exames de sangue e urina, as quais serão coletadas juntamente com as que serão utilizadas para os testes de acompanhamento, solicitados rotineiramente pelo seu médico. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações. As coletas de urina serão feitas pelo próprio paciente ou com o auxílio de profissionais treinados. Os riscos e desconfortos causados pela coleta de material biológico para o estudo são semelhantes aos envolvidos na coleta de sangue e urina para exames laboratoriais de rotina. Os dados advindos com a sua doação são de importância científica relevante para o estabelecimento de novos tratamentos para esta doença, bem

como para o melhor entendimento desta patologia. O material coletado será única e exclusivamente utilizado para fins do projeto de pesquisa, sendo reservado ao doador acesso às mesmas.

As informações individuais levantadas pela pesquisa são confidenciais. Os resultados obtidos serão agrupados e expressos através de resultados numéricos, sem qualquer referência a elementos que possam identificar as pessoas que participaram do estudo.

Todas as despesas relacionadas ao custo dos exames laboratoriais serão cobertas por verbas do próprio Projeto de Pesquisa, completamente gratuitas para o paciente.

Caso você queira se retirar em definitivo da pesquisa, terá total liberdade para fazê-lo, sem que isso prejudique a futuros atendimentos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O seu material (sangue) coletado será destruído e os seus dados excluídos do nosso banco de dados.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo (Profa. Dra. Carmen Regla Vargas e a mestrande Tatiane Cristina Hauschild) estarão à disposição para o esclarecimento de qualquer dúvida durante todo o andamento da pesquisa, no serviço de Genética Médica do HCPA localizado no 3º andar, Fone: 3359.8011. Ainda, para maiores informações, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, através do telefone (51) 33597640, das 8h às 17h, de segunda à sexta-feira.

Este documento foi elaborado em duas vias, sendo que uma delas será entregue a você, participante da pesquisa, e a outra será mantida com o nosso grupo de pesquisa.

Pelo presente consentimento, declaro que fui devidamente informado sobre o projeto de pesquisa, de forma clara e detalhada, da liberdade de não participar do estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Data: ___/___/___

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura: _____

Nome do pesquisador _____ Assinatura: _____

8.5 ANEXO 5: PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 170618

Data da Versão do Projeto: 22/11/2017

Pesquisadores:

CARMEN REGLA VARGAS

MOACIR WAJNER

TATIANE CRISTINA HAUSCHILD

ALINE KAYSER

DANIELLA DE MOURA COELHO

Título: Dano oxidativo a biomoléculas induzido pela Aloisoleucina e outros metabólitos acumulados na Doença da Urina do Xarope do Bordo: Efeito da L-carnitina

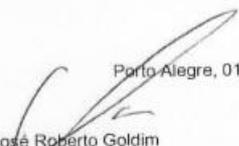
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 01 de dezembro de 2017.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA