

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE
PACIENTES COM FENILCETONÚRIA NO ESTADO DA
BAHIA

CAÍQUE ANTUNIS NOVAES SILVA

Salvador – Bahia

2018

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE
PACIENTES COM FENILCETONÚRIA NO ESTADO DA
BAHIA**

CAÍQUE ANTUNIS NOVAES SILVA

Orientador: Prof. Dr^a Angelina Xavier Acosta

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para a obtenção
do grau de Mestre

Salvador-Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Silva, Caíque Antunis

S586cCaracterização clínica e molecular de pacientes com fenilcetonúria no Estado da
Bahia./ Caíque Antunis Silva. - 2018.

80f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr^a. Angelina Xavier Acosta

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. Fenilcetonúria. 2. Genótipo. 3. Fenótipo. 4. BH4. I. Título.

CDU 575.21/22(813.8)

" CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM FENILCETONÚRIA NO ESTADO DA BAHIA."

CAÍQUE ANTUNIS NOVAES SILVA

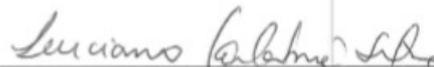
FOLHA DE APROVAÇÃO

SALVADOR, 24 DE JULHO DE 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Dalila Luciola Zanette
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Luciano Kalabric Silva
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Faísa Manuela Bonfim Machado Lopes
Bióloga
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

CAPES - Suporte de bolsa de estudos

CNPQ – Suporte Financeiro ao Projeto de Pesquisa

DEDICATÓRIA

Tudo que eu fizer, tudo que eu conquistar e tudo que eu sonhar será para vocês e por vocês: meus pais Carlos Antunis e Luciana Ana, razão de tudo.

Minha madrinha Ivani, início de toda minha vida escolar.

Minha companheira, amiga e fiel torcedora Pauliana, sempre comigo.

Meus familiares, que sempre serão meu melhor refúgio e minha fonte de força, tendo como base minhas avós Ana e Anita.

Tudo que eu conquistar não será meu, será nosso. Esse título é mais uma conquista que alcançamos.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus e nossa mãe Nossa Senhora Aparecida.

A Dr^a Angelina Xavier Acosta, pela orientação e apoio.

A Dr^a Tatiana Amorim, por ter aberto as portas da APAE-Salvador.

A todos os profissionais do Serviço de Referência em Triagem Neonatal da Bahia, que direta ou indiretamente, contribuíram com esse trabalho.

A todos os profissionais do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular - Anexo III do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, por todo suporte prestado durante o mestrado.

A todos os profissionais do Serviço de Genética Médica do HUPES-UFBA, pelo grande apoio e suporte prestados desde a época do estágio.

Aos professores e todos os profissionais do Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA, pelo suporte e assistência.

SILVA, Caíque Antunis Novaes. Caracterização clínica e molecular de pacientes com fenilcetonúria no Estado da Bahia. 80 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A fenilalanina (Phe) é um aminoácido essencial, sendo adquirido através da alimentação, e é hidroxilado em tirosina por ação da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Quando há uma deficiência na atividade desta enzima, ocorre um acúmulo de Phe (hiperfenilalaninemia – HPA) nos fluidos corporais, sendo tóxica especialmente no sistema nervoso central, ocasionando vários distúrbios, como deficiência intelectual. A fenilcetonúria (PKU) é a forma mais frequente de HPA, sendo o erro inato do metabolismo dos aminoácidos (EIM) mais bem estudado, por fazer parte de programas de triagem neonatal em todo o mundo. O tratamento clássico para essa doença, cuja herança genética é autossômica recessiva, é baseada na dietoterapia, que é complexa e de longa duração, tornando a adesão ao tratamento mais difícil. Sendo assim, outras opções terapêuticas que também controlam os níveis de Phe estão sendo sugeridas como a administração oral de tetrahidrobiopterina (BH4), que é o cofator da enzima PAH, sendo o genótipo um dos fatores determinantes para a responsividade a este tipo de tratamento. **OBJETIVO:** Definir o genótipo de pacientes com PKU no estado da Bahia e comparar com as características clínicas, sócio-demográficas, além de avaliar resposta terapêutica ao BH4. **MATERIAL E MÉTODOS.** Pacientes com diagnóstico de PKU provenientes da APAE/Salvador foram selecionados para investigação molecular por PCR/RFLP e sequenciamento do gene *PAH*, em seguida comparados com os dados clínicos e de responsividade ao BH4. **RESULTADOS:** Participaram do estudo 106 pacientes oriundos de 63 municípios baianos, sendo 73 pacientes com forma clínica de PKU clássica e 33 com PKU leve. A estratégia de investigação molecular permitiu genotipar toda a amostra, sendo a mutação IVS10-11G>A mais frequente (25,6%), seguida da p.V388M (23,2%) e p.R252W (17%), com diferente distribuição nos municípios estudados. Observaram-se 25 genótipos distintos, sendo a maioria (52,8%) como heterozigoto composto. A correlação genótipo-fenótipo mostrou concordância em 48,1% dos casos. O teste de responsividade ao BH4 realizado em 64 pacientes revelou responsividade em 29,7%, havendo concordância de 64,7% com a previsão fornecida pelo genótipo nos pacientes responsivos. **CONCLUSÃO:** a população da Bahia possui um perfil de mutações mais homogêneo quando comparado ao perfil de outros estados. A maioria das mutações encontradas é de origem europeia, principalmente da Península Ibérica. O genótipo se mostrou um bom preditor do curso clínico da doença nos casos em que o paciente apresentava mutações associadas à forma grave da PKU.

Palavras-chave: Fenilcetonúria, Genótipo, Fenótipo, BH4

SILVA, Caíque Antunis Novaes. Clinical and Molecular Characterization of Patients with Phenylketonuria in the State of Bahia. 80 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Phenylalanine (Phe) is an essential amino acid, being acquired through feed, and is hydroxylated in tyrosine by the action of the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH). When there is a deficiency in the activity of this enzyme, there is an accumulation of Phe (hyperphenylalaninemia - HPA) in the body fluids, being toxic especially in the central nervous system, causing several disorders, such as intellectual deficiency. Phenylketonuria (PKU) is the most frequent form of HPA, being the most studied inborn error of amino acid metabolism (EIM), since it is part of neonatal screening programs worldwide. The classic treatment for this disease, whose genetic inheritance is autosomal recessive, is based on diet therapy, which is complex and long-lasting, making adherence to treatment more difficult. Therefore, other therapeutic options that also control Phe levels are being suggested as the oral administration of tetrahydrobiopterin (BH4), which is the cofactor of the PAH enzyme, being the genotype one of the determining factors for the responsiveness to this type of treatment. **GOAL.** To define the genotype of patients with PKU in the state of Bahia and compare it with clinical, socio-demographic characteristics, besides evaluating therapeutic response to BH4. **MATERIAL AND METHODS.** Patients diagnosed with PKU from the APAE / Salvador were selected for molecular investigation by PCR / RFLP and sequencing of the PAH gene, then compared with the clinical and BH4 responsiveness data. **RESULTS:** A total of 106 patients from 63 Bahia municipalities participated in the study, of which 73 were patients with classic PKU and 33 with mild PKU. The molecular research strategy allowed to genotype the whole sample, with the most frequent IVS10-11GG A mutation, followed by p.V388M (23.2%) and p.R252W (17%), with different distribution in the studied municipalities. Twenty-five distinct genotypes were observed, the majority (52.8%) being a composite heterozygote. The genotype-phenotype correlation showed agreement in 48.1% of the cases. The BH4 responsiveness test performed in 64 patients revealed responsiveness in 29.7%, with a concordance of 64.7% with the prediction provided by the genotype in responsive patients. **CONCLUSION:** the population of Bahia has a more homogeneous mutation profile when compared to the profile of other states. The majority of the mutations found are of European origin, mainly from the Iberian Peninsula. The genotype proved to be a good predictor of the clinical course of the disease in cases in which the patient presented mutations associated with the severe form of PKU.

Keywords: Phenylketonuria, Genotype, Phenotype, BH4

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Reação de hidroxilação da fenilalanina e regeneração do cofator
BH4 16

Figura 2. Via alternativa de metabolização da Phe 17

Figura 3. Representação esquemática da entrada de Phe no SNC 18

Manuscrito 1

Figura 1. Distribuição das mutações mais frequentes nas mesorregiões da Bahia 38

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Classificação bioquímica das hiperfenilalaninemias	17
--	----

Manuscrito 1

Tabela 1. Caracterização clínico demográfica dos pacientes com PKU da Bahia avaliados neste estudo	35
--	----

Tabela 2. Distribuição geográfica dos pacientes com PKU nas mesorregiões da Bahia	36
---	----

Tabela 3. Distribuição alélica das mutações encontradas no presente estudo	37
--	----

Tabela 4. Distribuição dos genótipos dos pacientes com PKU investigados	39
---	----

Tabela 5. Correlação genótipo-fenótipo dos pacientes com PKU na Bahia	40
---	----

Manuscrito 2

Quadro 1. Metodologia do teste resposta ao BH4	58
--	----

Tabela 1. Distribuição alélica das mutações de 17 pacientes responsivos ao BH4	59
--	----

Tabela 2. Correlação genótipo-fenótipo dos pacientes responsivos ao BH4	60
---	----

Quadro 2. Comparação dos genótipos de pacientes responsivos ao BH4 na Bahia com dados da literatura	61
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
BH4	Tetrahidrobiopterina
DHPR	Diidrobiopterina redutase
DI	Deficiência Intelectual
EIM	Erro Inato do Metabolismo
GTP	Guanosina Trifosfato
HPA	Hiperfenilalaninemia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LNAA	Large Neutral Amino Acid
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
PAH	Fenilalanina Hidroxilase
PAL	Fenilalanina Amônia Liase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Phe	Fenilalanina
PKU	Fenilcetonúria
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição
SNC	Sistema Nervoso Central
SRTN	Serviço de Referência em Triagem Neonatal
Tyr	Tirosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	HISTÓRICO: A DESCOBERTA DA PKU	13
1.2	FENILCETONÚRIA	14
1.3	ASPECTOS BIOQUÍMICOS	15
1.4	ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO DA PKU	18
1.5	GENE <i>PAH</i> E MUTAÇÕES ASSOCIADAS À PKU	21
1.6	CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO	23
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	26
4	MANUSCRITO 1: Caracterização Clínica e Molecular de Pacientes com Fenilcetonúria da Bahia	28
5	MANUSCRITO 2: Responsividade à Tetrahydrobiopterina em Pacientes com Fenilcetonúria na Bahia	52
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXOS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO: A DESCOBERTA DA PKU

A história da Fenilcetonúria (PKU) começou em 1934, quando o químico norueguês Asbjorn Fölling foi contatado por um casal, Harry e Borgny Egeland, para estudar seus filhos, crianças aparentemente normais ao nascimento, mas que evoluíam com quadro de deficiência mental (DM) progressiva e, associado a isto, apresentavam um odor na urina. Fölling, após ser contatado pela família Egeland, adicionou cloreto férrico, um sal de ferro que leva a coloração marrom-avermelhada na presença de cetonas e observou o aparecimento de uma cor verde escura, uma reação ainda não descrita na época. Ensaio subsequentes culminaram com a detecção da excreção de ácido fenilpirúvico e fenilacetato, metabólitos da fenilalanina (Phe), como causa do odor presente na urina das duas crianças, sendo essa a primeira demonstração de uma anormalidade metabólica até então desconhecida. Asbjörn Fölling contatou instituições próximas a Oslo que atendiam crianças com deficiência intelectual (DI) e investigou o distúrbio metabólico em 430 indivíduos, tendo encontrado oito casos positivos. Tempos depois de ter conhecido a família Egeland, Fölling publicou seus achados, denominando a doença recém descoberta como “Imbecillitas Phenylpyruvica” (FÖLLING, 1934).

Em 1935, Lionel Penrose estudou a genealogia de algumas famílias afetadas anteriormente estudadas por Fölling e confirmou que tal doença metabólica era herdada como uma característica autossômica recessiva. Mais tarde, o nome fenilcetonúria (PKU) foi utilizado para descrever essa anormalidade (PENROSE e QUASTEL, 1937). A deficiência bioquímica responsável pela PKU foi identificada em 1947 por George Jervis, que mostrou que a administração de Phe causava rápida elevação nos níveis séricos de tirosina (Tyr) em indivíduos normais, mas em indivíduos com PKU isso não era observado. Estudos posteriores evidenciaram que a PKU era causada por uma deficiência no sistema enzimático hepático que converte Phe em Tyr, através de um processo de hidroxilação realizado pela enzima fenilalanina hidroxilase (PAH) (COOPER, 1952; JERVIS, 1953). Em 1953, Bickel e colaboradores estudaram os efeitos de uma dieta pobre em Phe em uma criança com a patologia e, tempos depois, pode-se verificar que a restrição alimentar precoce da Phe evitava a DI (BICKEL *et al.*, 1953). A PKU tornava-se, então, a primeira doença hereditária a ser tratada (SCRIVER e KAUFMAN, 2001).

Os primeiros testes de triagem de bebês começaram a ocorrer no final da década de 1950, consistindo em adicionar cloreto férrico em fraldas recentemente molhadas com a urina, porém, como a excreção do ácido fenilpirúvico demora a ocorrer, um resultado confiável deste teste da urina só poderia acontecer após algumas semanas de vida, conseqüentemente, este atraso reduzia a cobertura do teste e retardava o início do tratamento (CENTERWALL, 1957). O diagnóstico precoce da PKU só se tornou possível a partir dos estudos de Robert Guthrie, um médico que desenvolveu, na década de 1960, um método capaz de dosar fenilalanina em gotas de sangue coletadas em papel filtro. O teste de inibição bacteriana de Guthrie (GUTHRIE e SUSI, 1963) aumentou a sensibilidade nos primeiros dias de vida e proporcionou a triagem da PKU em larga escala.

Atualmente, a PKU é detectada pelo “teste do pezinho”, cuja obrigatoriedade consta no Estatuto da Criança e do Adolescente, inciso III do Artigo 10 da Lei nº 8069, de 13/07/1992.

1.2 FENILCETONÚRIA

A PKU (OMIM 261600) é uma doença genética, sendo a forma mais comum da hiperfenilalaninemia (HPA), cujo mecanismo de herança é autossômico recessivo e se caracteriza pela deficiência total ou parcial da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), a qual é codificada pelo gene *PAH* (localizado no cromossomo 12, região 12q22-q24.1). A grande maioria dos casos de HPA, em torno de 98%, está associada a mutações no gene *PAH*, porém, em 2% dos casos, mutações em enzimas envolvidas na síntese e/ou regeneração do cofator BH4 já foram descritas e associadas à HPA (SCRIVER E KAUFMAN, 2001).

As doenças genéticas de herança autossômica recessiva, como a PKU, em sua maioria, apresentam incidência populacional baixa. O aumento do número de afetados por este tipo de enfermidade depende da frequência alélica e da ocorrência de casamentos endogâmicos e, conseqüentemente, das taxas de consanguinidade, que aumentam a frequência de homozigotos em detrimento à de heterozigotos (BEIGUELMAN, 1996; BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001). Não só casamentos endogâmicos podem alterar a incidência dessas doenças, mas também fatores evolutivos, como a deriva genética e efeito fundador (BEIGUELMAN, 1996).

A PKU é a desordem mais comum no metabolismo dos aminoácidos, cuja incidência mundial é variável, sendo bastante frequente na Turquia (1:2.600 nascidos vivos) e pouco frequente no Japão (1:120.000 nascidos vivos) (SCRIVER e KAUFMAN, 2001). A frequência média de PKU na população europeia é de 1:10.000 nascidos vivos (SCRIVER & KAUFMAN, 2001). No Brasil, sua frequência varia entre 1:15.000 e 25.000 nascidos vivos (CARVALHO, 2003; VILARINHO *et al.*, 2006). Dados do Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) da Bahia (APAE-Salvador) mostram incidência de 1:16.334 no Estado (AMORIM *et al.*, 2011).

1.3 ASPECTOS BIOQUÍMICOS

A Phe é um aminoácido essencial e sua ingestão se faz necessária tanto para manter os níveis homeostáticos da mesma como para a síntese protéica. A maior parte da concentração de Phe ingerida é hidroxilada a Tyr e o restante é convertida, somente se a Phe estiver em excesso, a outros metabólitos (primeiramente a fenilpiruvato que é posteriormente convertido a fenilactato e fenilacetato) (KAUFMAN, 1976). O processo de hidroxilação da L-Phe, em L-Tyr ocorre principalmente no fígado, visto que a enzima responsável pela reação está ativa nos hepatócitos. A hidroxilação é catalisada pela enzima PAH. A conversão da Phe a Tyr requer oxigênio molecular e tetraidrobiopterina (BH₄).

O cofator BH₄ é oxidado a diidrobiopterina nesta reação e, em seguida, é regenerado pela diidrobiopterina redutase (DHPR), que utiliza NADH para realizar a redução. A regeneração do BH₄ é de fundamental importância, já que ele é sintetizado no organismo a partir da guanosina trifosfato (GTP), que existe em quantidades limitadas, assim o ciclo de redução e oxidação do BH₄ permite a contínua produção de Tyr a partir de Phe, dependendo somente da disponibilidade da mesma (GÜTTLER, 1980; SCRIVER e KAUFMAN, 2001). O BH₄ também é cofator da tirosina hidroxilase e da triptofano hidroxilase, que são importantes na produção de dopamina, catecolaminas, melanina, serotonina e na síntese do óxido nítrico a partir da tirosina (BLAU *et al.*, 2001). A reação de hidroxilação da fenilalanina em tirosina e regeneração do cofator tetraidrobiopterina (BH₄) pode ser observada esquematicamente na Figura 1.

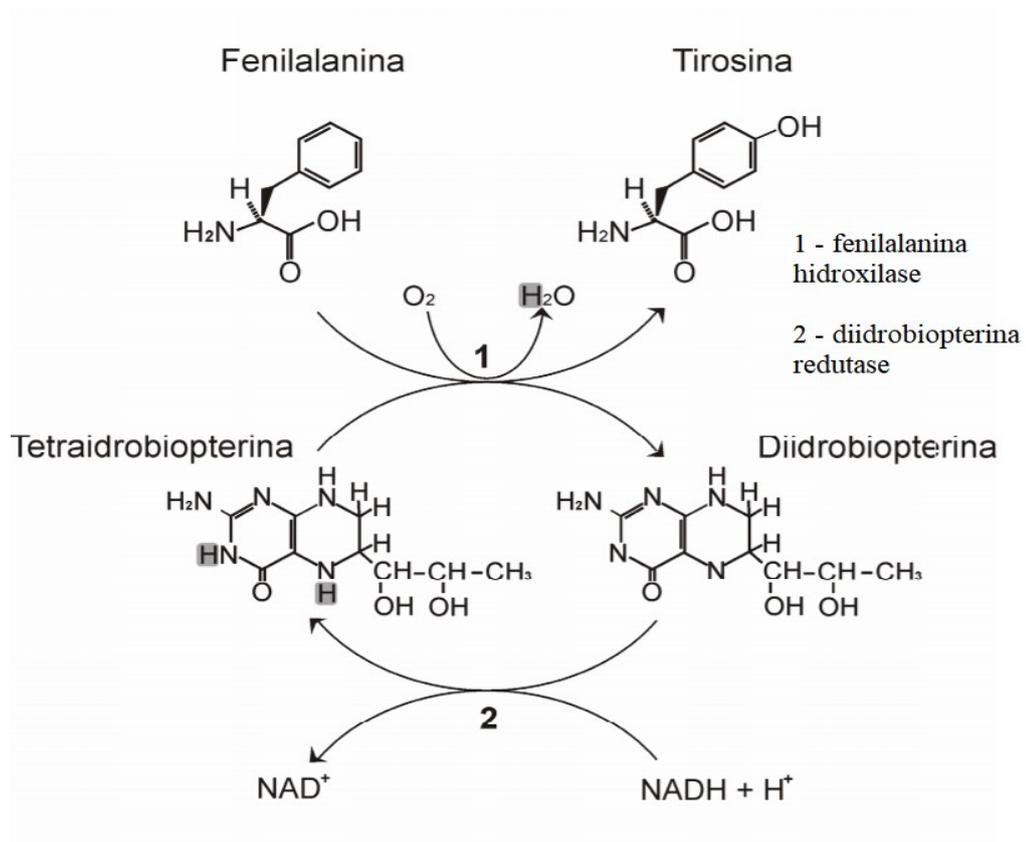


Figura 1. Reação de hidroxilação da fenilalanina e regeneração do cofator BH4.

Quando a enzima PAH está defeituosa, a via metabólica secundária de conversão da Phe será ativada devido ao excesso da mesma. A via catabólica alternativa do excesso de Phe é a da transaminação a fenilpiruvato, seguida da descarboxilação deste metabólito, que origina fenilacetato, ou da redução, que leva à produção do fenilactato. O fenilacetato poderá, posteriormente, ser conjugado com a glutamina e produzir fenilacetilglutamina (NELSON e COX, 2002; SMITH *et al.*, 2007). A figura 2 evidencia a via metabólica secundária da Phe.

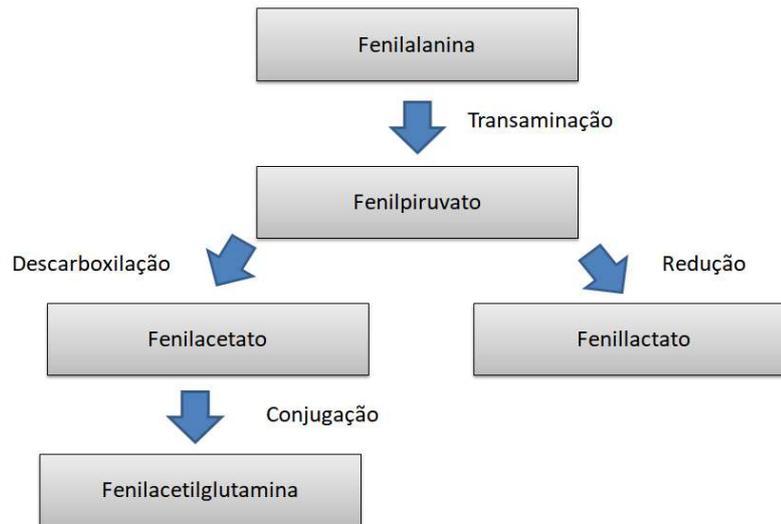


Figura 2. Via alternativa de metabolização da Phe.

As HPA podem ser classificadas bioquimicamente em PKU clássica, PKU leve e HPA não-PKU (Tabela 1). APKU clássica é definida quando a concentração de Phe sérica ao diagnóstico é acima de 20mg/dL (1.200 μ mol/L) e a atividade estimada da PAH menor que 1%, sendo necessário tratamento dietético imediato. A PKU leve apresenta níveis séricos de Phe ao diagnóstico de 10 a 20mg/dL (600 a 1.200 μ mol/L) com atividade enzimática residual estimada de 1 a 3%, também necessitando de tratamento precoce. Na HPA não-PKU, encontra-se atividade enzimática residual maior que 3%, o que leva a níveis séricos de Phe ao diagnóstico entre 4 e 10mg/dL (240 e 600 μ mol/L), insuficientes para levar a dano neurológico, não sendo necessário tratamento (KOCH e WENZ, 1987).

Tabela 1. – Classificação bioquímica das hiperfenilalaninemias.

FENÓTIPO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	NÍVEL DE Phe NO PLASMA
PKU CLÁSSICA	< 1%	> 20mg/100mL
PKU LEVE	1 a 3%	10 a 20 mg/100mL
HPA NÃO PKU	> 3%	4 a 10 mg/100mL

1.4 ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO DA PKU

O recém-nascido com PKU geralmente apresenta-se normal durante os primeiros meses de vida, porém, por volta dos seis meses de idade, o retardo do desenvolvimento neuropsicomotor é frequentemente observado. O aumento dos níveis séricos de Phe e seus metabólitos levam aos principais sinais e sintomas da doença, que se manifestam em diferentes intensidades; atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, alterações cutâneas, hiperatividade, comportamento agressivo, tremores, microcefalia, odor característico na urina, convulsões, entre outros sinais e sintomas (FOIS *et al*, 1955; PAINE, 1957; NYHAN, 1979; SCRIVER, 1995).

A etiopatogenia dos problemas cognitivos que afetam os pacientes não está totalmente clara, havendo vários mecanismos envolvidos em diferentes níveis. Uma das explicações para os danos cerebrais causados pelo excesso de Phe é que esse aminoácido essencial compete com outros grandes aminoácidos por proteínas carreadoras responsáveis pela absorção de aminoácidos pelo sistema nervoso central (SNC): a Phe usa, para atravessar a barreira hematoencefálica, o mesmo receptor de membrana que os demais aminoácidos grandes e neutros (LNAA). Assim, a HPA, concomitantemente aumenta os níveis cerebrais de Phe e reduz o nível de outros aminoácidos essenciais para síntese de proteínas e neurotransmissores (Figura 3) (BLAU, 2014). A produção da mielina também é prejudicada pelo excesso de Phe no SNC, tanto por conta da competição desse para com os outros, como por falta de aminoácidos precursores.

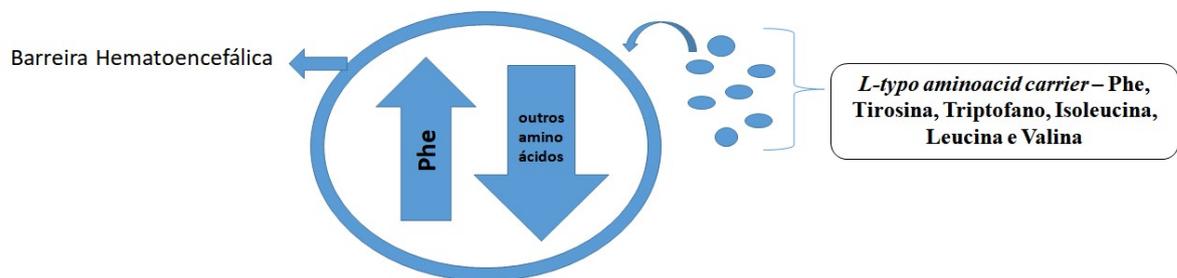


Figura 3. Representação esquemática da entrada de Phe no SNC.

O tratamento da PKU consiste em uma dieta restrita em Phe, mas apresenta alguns inconvenientes, tais como a adesão do paciente a uma dieta restritiva e as implicações sócio afetivas que podem advir desta realidade. Os alimentos permitidos na alimentação de pessoas com PKU são os que contêm baixos teores de Phe (zero a 20mg Phe/100g de alimento). Estão incluídos: mel, balas de frutas e de gomas, pirulitos de frutas, picolés de frutas, algodão-doce, geléias de frutas, goiabada, farinha de tapioca, polvilho de mandioca, sagu. Entre as bebidas estão os sucos de frutas artificiais, refrigerantes isentos de aspartame, groselha, café, chá e alguns cremes e pudins nos sabores baunilha, morango e caramelo e pós para milk-shake isentos de Phe. Os alimentos proibidos na PKU são os que têm alto teor de Phe. Entre eles estão as carnes e derivados, o feijão, ervilha, soja, grão-de-bico, lentilha, amendoim, leite e derivados, achocolatado, ovos, nozes, gelatinas, bolos, farinha de trigo, alimentos industrializados com altos teores de fenilalanina, pães em geral, biscoitos, e alimentos para fins especiais contendo aspartame (MONTEIRO e CÂNDIDO, 2006).

Como consequência da dieta, os pacientes com PKU ingerem poucas proteínas de alto valor biológico. Assim, essa falta é suprida por um alimento medicinal, denominado forma metabólica. Essa fórmula é isenta de Phe e fornecem os nutrientes necessários para a suplementação da dieta.

A dieta restrita em Phe deve ser iniciada precocemente, assim, as manifestações clínicas indesejáveis da PKU serão evitadas. Os resultados são menos favoráveis quando o tratamento se inicia de forma tardia, mas mesmo assim, deve ser realizado (LYON *et al.*, 2006).

Apesar de a dieta restrita em Phe ser o padrão-ouro do tratamento da PKU, a dificuldade de adesão à mesma, principalmente na idade escolar e adolescência faz com que outras formas de tratamento sejam propostas e estudadas para melhor atender as necessidades dos pacientes (MITCHELL; SCRIVER, 2010). Tais vias alternativas de tratamento incluem:

- I. Suplementação de Large Neutral Amino Acids (LNAA): A suplementação de LNAA reduz os níveis de Phe no cérebro, visto que Phe, Tyr, triptofano, isoleucina, leucina e valina competem pelo mesmo transportador (L-tyro aminoacid carrier) para ultrapassar a barreira hematoencefálica (WATER *et al.*, 2006; MITCHELL; SCRIVER, 2010).

- II. Suplementação com administração de BH4: Segundo Burnett e colaboradores, a forma sintética oral do BH4, Sapropterin dihidroclorato (Kuvan®) é uma terapia segura e eficaz em pacientes com PKU leve e moderada e também para alguns pacientes com a forma mais grave da doença, desde que os mesmos respondam positivamente aos testes de sobrecargas de Phe com Kuvan® (MITCHEL; SCRIVER, 2010; BLAU, 2014). A genotipagem de pacientes com PKU pode auxiliar na identificação de potenciais respondedores ao tratamento com BH4. Estudos dos genótipos de pacientes responsivos indicam que a combinação de mutações do gene *PAH* é o indicador mais importante na responsividade ao BH4. Se duas mutações graves constituírem o genótipo do paciente, estando associadas com PKU clássica, muito possivelmente não haverá nenhuma atividade enzimática residual da PAH, tornando o paciente um possível não-respondedor ao BH4. Da mesma forma, pacientes com duas mutações leves podem ter alguma atividade residual e, possivelmente, podem responder ao tratamento com BH4 (BLAU E ERLANDSEN, 2004). Alguns pacientes com PKU clássica têm sido relatados como respondedores, mas todos eles têm pelo menos um alelo com uma mutação menos grave (MATALON *et al.*, 2004).
- III. Terapia enzimática: a terapia com a enzima fenilalanina amônia liase (PAL) pode ser útil para pacientes que possuem baixa ou nenhuma atividade enzimática da PAH. A PAL é uma enzima que não requer cofator e tem atividade sintética semelhante à PAH (MACDONALD; D’CUNHA, 2007).
- IV. Terapia gênica: essa abordagem terapêutica consiste em introduzir um gene funcional recombinante no fígado de um indivíduo afetado para suprir a função do gene defeituoso. Tal abordagem necessita da clonagem da PAH que produza uma proteína funcional e um vetor que possa transferir este clone aos hepatócitos. Os testes em animais mostraram-se eficazes a curto prazo, mas os efeitos terapêuticos não duram por muito tempo (EISENSMITH E WOO, 1996; KARAM, 2004).

1.5 GENE *PAH* E MUTAÇÕES ASSOCIADAS À PKU

O produto normal do gene *PAH* é a proteína fenilalanina-4-mono-oxigenase (PAH), formada por 452 aminoácidos, apresentando-se na forma tetramérica quando ativa e dimérica quando inativa. Os monômeros da PAH são compostos por três domínios: regulatório (resíduos 1 ao 142), catalítico (resíduo 143 ao 410), onde se forma o sítio de ligação ao cofator BH₄ e o domínio de tetramerização (resíduo 411 ao 452). O gene *PAH* é altamente polimórfico, de cópia única, e localiza-se no cromossomo 12, região 12q22-q24.1 e é composto por 13 éxons.

Até o presente o momento, mais de 800 mutações já foram descritas no gene *PAH* (<http://www.biopku.org/home/pah.asp> - acesso em maio de 2018). Destas mutações, um pequeno número é bastante prevalente, enquanto a grande maioria é rara. Assim, a maioria dos pacientes com PKU em populações miscigenadas são heterozigotos compostos (SCRIVER e KAUFMAN, 2001; SCRIVER, 2007). A maior parte das mutações no gene *PAH* são mutações do tipo missense (mutações de sentido trocado) (60%), seguido das mutações do tipo deleções (13,4%), *splicing* (10,93%), silenciosas (5,6%), nonsense (4,6%) e inserção (1,76%) (NOWACKI *et al.*, 1998; SCRIVER *et al.*, 2000; Phenylalanine Hydroxylase Knowledgebase, 2018). O grande número de mutações em conjunto com o fato de que, na maioria dos casos, os afetados são heterozigotos compostos, explica a grande variabilidade clínica da doença (SCRIVER, 2001).

A atividade cinética ou a estabilidade da enzima PAH pode elencar três tipos de mutações: I – mutações que afetam a estabilidade e a cinética da enzima. II – mutações que afetam a cinética da enzima. III – mutações que alteram a estabilidade da PAH, sem alteração da cinética (VACCARO, 2008).

A maioria das mutações descritas está localizada no éxon 7 do gene *PAH*, porém a mutação p.R408W, localizada no éxon 12, é a mais frequentemente identificada das mutações em diversos estudos realizados em diferentes populações, seguida da IVS10-11G>A, p.I65T e p.R261Q, sendo as demais mutações menos frequentes (SCRIVER *et al.*, 2001). Estudos brasileiros anteriores mostram 7 mutações no gene *PAH* (IVS10-11G>A, p.V388M, p.R261Q, p.R252W, p.R261X, p.I65T e p.R408W) entre as mais frequentes na população (ACOSTA *et al.*, 2001; SANTANA-DA-SILVA *et al.*, 2003; SANTOS, 2004; VACCARO, 2008, AMORIM, 2010). Tais mutações foram as escolhidas no presente trabalho para a triagem mutacional inicial nos pacientes com PKU da Bahia. Considerando a região Nordeste do

Brasil, as mutações mais frequentemente encontradas são: IVS10-11G>A; p.V388M; p.I65T e p.R252W (AMORIM, 2010).

A mutação p.I65T ocorre no éxon 3 do gene *PAH*, provocando a substituição do aminoácido isoleucina por treonina na proteína PAH, causada pela transição de T para C na posição 194 do cDNA (JOHN *et al.*, 1992). A mutação, em genótipo homocigoto ou heterocigoto pode estar associada à PKU clássica ou PKU leve (JOHN *et al.*, 1992). Os variados fenótipos gerados por essa mutação podem ser explicados pela natureza da mutação, localizada na região regulatória da enzima (ERLANDSEN *et al.*, 2003; BLAU, 2002). É uma das mutações mais frequente na região da Península Ibérica e da Itália (RIVERA *et al.*, 1998; DIANZANI *et al.*, 1995) e foi identificada como a mais frequente na população sul do Brasil (SILVA *et al.*, 2003).

A mutação p.R252W ocorre no éxon 7 do gene *PAH* e provoca a substituição do aminoácido arginina por triptofano e alterando o domínio catalítico da enzima, estando associada à PKU clássica (GJETTING *et al.*, 2001). Esta mutação tem sido descrita em diversos estudos europeus, especialmente aqueles que avaliaram populações mediterrâneas (GULDBERG *et al.*, 1998; RIVERA *et al.*, 1998; DESVIAT *et al.*, 1999; GIANATTASIO *et al.*, 2001; ZSCHOCKE *et al.*, 2003), e também em estudos realizados com pacientes do sul e sudeste do Brasil (ACOSTA *et al.*, 2001; SANTANA-DA-SILVA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2006). A mutação foi descrita em estudos anteriores (AMORIM, 2010; QUEIROZ, 2015) como muito frequente no município de Monte Santo (BA).

A mutação p.R261X é caracterizada pela transição de C para T na posição 781 do cDNA, no éxon 7 do gene *PAH*, gerando um stop códon (DWORNICZAK *et al.*, 1991). Por estar localizada no domínio catalítico da enzima, está associada ao fenótipo de PKU clássica (JENNINGS *et al.*, 2000). É frequente na região da Península Ibérica e da Itália (RIVERA *et al.*, 1998; DIANZANI *et al.*, 1995) e teve frequência de 9,8% na população com PKU do sul Brasil (SILVA *et al.*, 2003).

A mutação R261Q ocorre no éxon 7 do *PAH*. Promove a substituição da arginina pela glutamina no códon 261 e afeta o domínio catalítico da enzima (BLAU, 2002). O fenótipo pode variar de PKU leve à clássica. Essa mutação apresenta frequência elevada na Suíça (EISENSMITH *et al.*, 1992) e também na Itália (DIANZI *et al.*, 1995) e apareceu com certa frequência no nordeste do Brasil (AMORIM, 2010).

A mutação p.R408W possui alta frequência em diferentes populações, pois está localizada em um dinucleotídeo CpG, local recorrente de mutações no genoma humano (MURPHY *et al.*, 2006). É a mutação mais frequentes em populações européias

(ZSCHOCKE, 2003). Caracteriza-se por uma troca de C para T no nucleotídeo 1222 do cDNA, causando a substituição de uma arginina por um triptofano no resíduo 408 da enzima PAH. Está localizada no domínio de tetramerização e relaciona-se com o fenótipo de PKU clássica.

A Mutação p.V388M é uma das mutações mais citadas em diversos estudos brasileiros (AMORIM, 2010; SILVA *et al.*, 2003; POLLICE, 2008; NETO *et al.*, 2018, ACOSTA *et al.*, 2012). Localizada no éxon 11 do PAH e no domínio catalítico da enzima, estando associada ao fenótipo de PKU moderada/leve.

A mutação IVS10-11G>A foi a mutação mais frequente na população nordeste do Brasil (AMORIM, 2010). É a mutação mais frequentemente encontrada em Portugal e em toda a orla mediterrânea (VILARINHO, 2006). Essa mutação afeta o sítio de splice entre o intron 10 e o éxon 11 e está associada ao fenótipo de PKU clássica.

1.6 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

A possibilidade de associação entre mutação e fenótipo faz com que o estudo das mutações em indivíduos com PKU seja importante, pois, algumas mutações associam-se à formas graves da doença, enquanto outras estão associadas à formas mais leves. Portanto, segundo Martins e colaboradores (2006), ao conhecer o genótipo do paciente logo após o diagnóstico, pode-se fazer algumas previsões em relação ao seu prognóstico e ajustar melhor o tratamento.

O tipo de mutação não é um forte preditor do desenvolvimento clínico do paciente, contudo, estudos têm demonstrado uma correlação entre o genótipo e a tolerância à Phe (GUTTLER *et al.*, 2006). A genotipagem de pacientes com PKU é, também, um meio de identificar possíveis respondedores ao BH4, visto que uma série de mutações foram associadas com responsividade ao fármaco. A lista completa das mutações está disponível no BIOPKU *database* (http://www.biopku.org/BH4_Start.asp).

2. JUSTIFICATIVA

Os estudos dos genótipos dos pacientes com PKU são importantes, dentre outros motivos, pela possibilidade da associação entre a mutação presente e o fenótipo observado. Algumas mutações associam-se a formas graves da doença, enquanto outras se associam às formas mais leves. Portanto, conhecendo o genótipo do paciente logo após o diagnóstico neonatal, pode-se fazer previsões em relação ao seu prognóstico e, assim, planejar melhor o tratamento.

A PKU apresenta forte impacto sobre a qualidade de vida dos afetados e familiares, assim, o diagnóstico constitui prioridade, pois existem tratamentos disponíveis. O tratamento dietético é o padrão ouro para o tratamento dessa doença, mas apresenta alguns inconvenientes, tais como a adesão do paciente a uma dieta restritiva e as implicações sócio-afetivas que podem advir desta realidade. Utilizando a abordagem molecular, esses problemas podem ser minimizados, contribuindo para o diagnóstico definitivo da PKU em casos mais complexos, bem como o estabelecimento da correlação genótipo-fenótipo (SANTOS *et al*, 2010; AMORIM, 2010).

Vias alternativas de tratamento devem ser propostas, por isso a identificação de indivíduos responsivos ao BH₄, juntamente com a investigação molecular é de grande relevância (ZURFLUH *et al.*, 2008). Além disso, a partir dessa investigação molecular é possível fazer um esclarecimento adicional à família afetada. Vale salientar que o Brasil não possui distribuição homogênea dos serviços de genética médica bem estruturados, os quais estão centralizados basicamente nas regiões Sul e Sudeste do país (HOROVITZ, LLERENA, DE MATTOS, 2005) havendo uma enorme carência nas demais regiões, o que leva a uma desigualdade no atendimento desses pacientes.

Diante do exposto, devido principalmente as altas taxas de endogamia e consanguinidade no estado da Bahia (no Nordeste, a taxa chega a 15%) (SOARES, 2012), estudos moleculares são necessários para realizar um diagnóstico genotípico dos pacientes com PKU do Estado. A partir da implantação de uma estratégia de investigação molecular regionalizada, será possível fornecer um suporte de diagnóstico/tratamento dos indivíduos, fortalecendo, assim, as ações de genética do SUS como proposto pela Política Nacional de Atenção às Pessoas com Doenças Raras, instituído recentemente pelo projeto de lei do senado nº 530 de 2013.

Com a realização deste estudo, avaliando indivíduos da Bahia, a estratégia de investigação das bases moleculares da PKU, bem como do tratamento dos pacientes,

poderá ser aperfeiçoada, pois conheceremos o padrão de distribuição das mutações responsáveis por essa doença em todo o Estado, proporcionando uma visão ampla dos pacientes com PKU.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

3.1.1 Definir o genótipo de pacientes com Fenilcetonúria no estado da Bahia e correlacioná-lo com as características clínicas, sociodemográficas, moleculares e de resposta ao BH4.

3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar o perfil clínico e sociodemográfico dos pacientes com PKU;

3.2.2 Investigar mutações no gene da fenilalanina hidroxilase (PAH) nos pacientes selecionados;

3.2.3 Descrever a distribuição das mutações do gene *PAH* no estado da Bahia;

3.2.4 Realizar correlação genótipo-fenótipo;

3.2.5 Realizar teste de responsividade ao BH4 e correlacionar com os genótipos e formas clínicas de PKU.

A metodologia, os resultados e a discussão desta dissertação estão descritos nos manuscritos 1 e 2 a seguir.

4. MANUSCRITO 1– Caracterização Clínica e Molecular de Pacientes com Fenilcetonúria da Bahia.

- Este artigo corresponde ao proposto nos objetivos 3.1.1; 3.2.1; 3.2.2; 3.2.3 e 3.2.4
- Este artigo apresenta resultados compilados da atual dissertação e também da tese “Estudo das Bases Moleculares da Fenilcetonúria no Nordeste do Brasil”.
- Situação do artigo: Em fase final de redação para posterior publicação.

Caracterização Clínica e Molecular de Pacientes com Fenilcetonúria da Bahia

Silva CAN¹, Amorim T^{2,3}, Leite MEQ^{2,4}, Philadelpho VO³, Acosta AX^{1,4}.

¹Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM)/FIOCRUZ-BA; ²Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador; ³Universidade do Estado da Bahia; ⁴Universidade Federal da Bahia

Resumo

A deficiência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), codificada pelo gene *PAH*, determina a Fenilcetonúria (PKU), erro inato do metabolismo dos aminoácidos mais comum, cujo diagnóstico é amplamente realizado através da triagem neonatal. O gene *PAH* é altamente heterogêneo, havendo mais de 800 mutações diferentes, cuja frequência de cada uma varia entre as populações. Neste estudo caracterizamos clínica e molecularmente pacientes com PKU do estado da Bahia. A maioria dos pacientes (68,9%) apresentou fenótipo bioquímico de PKU clássica. A mesorregião metropolitana de Salvador e a nordeste foram as mesorregiões responsáveis pelo maior número de pacientes. Através da pesquisa de sete mutações mais comuns, citadas em estudos anteriores, a triagem mutacional por PCR/RFLP identificou 95,2% dos alelos da amostra. As mutações mais frequentes foram IVS10-11G>A (25,6%), seguida pela p.V388M (23,2%) e p.R252W (17%). A mutação p.R252W foi especialmente frequente no nordeste da Bahia, principalmente por conta do município de Monte Santo. A correlação genótipo-fenótipo mostrou concordância em 48,1% dos pacientes, sendo mais frequente entre os casos de PKU clássica.

Palavras-chave: Fenilcetonúria, genótipo, Bahia

Clinical and Molecular Characterization of Patients with Phenylketonuria of Bahia

Silva CAN¹, Amorim T^{2,3}, Leite MEQ^{2,4}, Philadelpho VO³, Acosta AX^{1,4}.

¹Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM)/FIOCRUZ-BA; ²Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador; ³Universidade de Estado da Bahia; ⁴Universidade Federal da Bahia

Abstract

The deficiency of the phenylalanine hydroxylase (PAH) enzyme activity, codified by the *PAH* gene, determines Phenylketonuria (PKU), the most common inborn error of amino acid metabolism, whose diagnosis is widely performed through neonatal screening. The *PAH* gene is highly heterogeneous, with more than 800 different mutations, the frequency of which varies between populations. In this study, we characterized clinically and molecularly patients with PKU from the state of Bahia. The majority of patients (68.9%) presented a classical PKU biochemical phenotype. The metropolitan mesoregion of Salvador and to the northeast were the mesoregions responsible for the largest number of patients. Through the search for seven common mutations cited in previous studies, mutational PCR / RFLP screening identified 95.2% of the alleles in the sample. The most frequent mutations were IVS10-11G> A (25.6%), followed by p.V388M (23.2%) and p.R252W (17%). The p.R252W mutation was especially frequent in the northeast of Bahia, mainly due to the municipality of Monte Santo. The genotype-phenotype correlation showed concordance in 48.1% of the patients, being more frequent among cases of classical PKU.

Keywords: Phenylketonuria, genotype, Bahia

Introdução

A Fenilcetonúria (PKU) (OMIM ¹261600) é uma hiperfenilalaninemia (HPA), herdada de forma autossômica recessiva e se caracteriza pela deficiência total ou parcial da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), que é codificada pelo gene *PAH*. A grande maioria dos casos de PKU, em torno de 98%, está associada a mutações no gene *PAH*. É o mais comum dos erros inatos do metabolismo dos aminoácidos, cuja incidência mundial é variável, sendo bastante frequente na Turquia (1:2.600 nascidos vivos) e pouco frequente no Japão (1:120.000 nascidos vivos) (SCRIVER & KAUFMAN, 2001). A frequência média de PKU na população europeia é de 1:10.000 nascidos vivos (SCRIVER & KAUFMAN, 2001). No Brasil, sua frequência varia entre 1:15.000 e 25.000 nascidos vivos (CARVALHO, 2003; VILARINHO *et al.*, 2006). Dados do Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) da Bahia (APAE-Salvador) mostram incidência de 1:16.334 no Estado (AMORIM *et al.*, 2011).

Bioquimicamente, a PKU pode ser classificada em PKU clássica, PKU leve e HPA não-PKU. Na PKU clássica a concentração de Phe sérica ao diagnóstico é acima de 20mg/dL (1200µmol/L) e a atividade estimada da PAH menor que 1%, sendo necessário tratamento dietético imediato. A PKU leve apresenta níveis séricos de Phe entre 10 e 20mg/dL (600 e 1200µmol/L) com atividade enzimática residual estimada de 1 a 3%, e também necessita de tratamento precoce. Na HPA não-PKU, encontra-se atividade enzimática residual maior que 3%, o que leva a níveis séricos de Phe entre 4 e 10mg/dL (240 e 600µmol/L), insuficientes para levar a dano neurológico, não sendo necessário tratamento (KOCH & WENZ, 1987).

A maioria das mutações descritas está localizada no éxon 7 do gene *PAH*, porém a mutação p.R408W, localizada no éxon 12, é a mais frequentemente identificada das mutações em diversos estudos realizados em diferentes populações, seguida da IVS10-11G>A, p.I65T e p.R261Q. Estudos brasileiros anteriores (ACOSTA *et al.*, 2001; SANTANA-DA-SILVA *et al.*, 2003; L.L. SANTOS *et al.*, 2008) mostram 7 mutações no gene *PAH* (IVS10-11G>A, p.V388M, p.R261Q, p.R261X, p.R252W, p.I65T e p.R408W) entre as mais frequentes na população.

A depender da gravidade do efeito da mutação sobre a enzima, esta pode exibir diferentes atividades residuais, variando de nula até 75% da atividade normal (OKANO *et al.*, 1991) e, conseqüentemente, predizer fenótipos bioquímicos diversos. Tal predição pode

¹Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

permitir a otimização da escolha do tratamento, especialmente naqueles pacientes que se beneficiariam do uso da tetrahydrobiopterina (BH4), cofator na reação da hidroxilação da Phe em Tirosina (Tyr) (FIEGE & BLAU, 2007; ZURFLÜH *et al.*, 2008), portanto, conhecer o genótipo do paciente logo após o diagnóstico pode ser útil para se fazer algumas previsões em relação ao seu prognóstico e ajustar melhor o tratamento (MARTINS *et al.*, 2006). Um sistema universal de predição do fenótipo das HPA a partir do genótipo foi proposto por Guldberg e colaboradores, em 1998 e é amplamente utilizado para correlação genótipo-fenótipo, além de dados existentes no BioPKU *database* (<http://biopku.org/biopku/search-allele-start.asp>).

O objetivo deste estudo foi definir o genótipo de pacientes com PKU no estado da Bahia e correlacioná-lo com as características clínicas e epidemiológicas, bem como associar os dados dos fenótipos bioquímicos observados com os fenótipos previstos pelos genótipos encontrados.

Materiais e Métodos

Neste estudo foram incluídos 106 pacientes com fenótipo bioquímico de PKU, definido como Phe sérica $\geq 10\text{mg/dL}$, em tratamento dietético convencional no SRTN da Bahia - APAE/Salvador. Os pacientes selecionados foram diagnosticados através da triagem neonatal e também por diagnóstico tardio, a partir de suspeita clínica. Pacientes que foram transferidos para outros SRTN e/ou que abandonaram o tratamento não foram incluídos no estudo.

Dos participantes deste estudo foram obtidos dados demográficos, como: idade, sexo, naturalidade; e também dados clínicos: relato de consanguinidade, forma do diagnóstico, fenótipo bioquímico e idade do início do tratamento.

Como estratégia de triagem mutacional, realizou-se análise molecular a partir da investigação de sete mutações mais frequentes no gene *PAH* descritas em estudos brasileiros anteriores (ACOSTA *et al.*, 2001; SANTANA-DA-SILVA *et al.*, 2003; L.L. SANTOS *et al.*, 2008): IVS10-11G>A, p.V388M, p.R261Q, p.R261X, p.R252W, p.I65T e p.R408W. Utilizou-se PCR (reação em cadeia da polimerase) seguido de RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição) como técnicas de genotipagem, a partir de protocolos previamente descritos (SAIKI *et al.*, 1988).

Desta forma, a partir da coleta de cerca de 5-10mL de sangue periférico de cada paciente em tubos contendo anticoagulante EDTA, extraiu-se o DNA genômico pelo kit PureLink® Genomic DNA Kits, cujas amostras foram amplificadas por PCR, utilizando o termociclador AppliedBiosystems 2720 Thermal Cycler. Os produtos de amplificação foram submetidos à técnica de RFLP, utilizando enzimas de restrição específicas para os éxons 3 (*TaqI*), 7 (*HinfI*, *Dde* e *AvaI*), 11 (*BsaAI* e *DdeI*) e 12 (*StyI*) do gene *PAH*, as quais permitiram a genotipagem direcionada para as mutações selecionadas.

Para as amostras dos pacientes que não tiveram seu genótipo completamente definido pela técnica de PCR/RFLP, realizou-se sequenciamento completo do gene *PAH* pela técnica de Sanger (SANGER F *et al.*, 1977; CARRARO & KITAJIMA, 2002). Com a elucidação dos genótipos dos pacientes, foi possível estabelecer uma correlação entre o fenótipo previsto e o fenótipo observado, utilizando como referência as informações contidas no *PAH database* (<http://www.biopku.org/biopku/search-allele-start.asp>).

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva, usando medida de tendência central (média), medidas de dispersão (valores mínimo e máximo) e cálculos de medidas de frequência. Este estudo obteve aprovação pelo Comitê de

Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (número do parecer: 1.410.934 / 16/02/2016).

Resultados

Neste trabalho foram investigados 106 pacientes com diagnóstico bioquímico de PKU e em tratamento dietético acompanhados no SRTN da Bahia - APAE/Salvador. A informação sobre a idade de início do tratamento estava disponível em 81 pacientes diagnosticados através da triagem neonatal e a média da idade da primeira consulta foi de 46,9 dias. A Tabela 1 mostra a caracterização geral da amostra analisada, de acordo com a distribuição por sexo, idade atual do paciente, forma de diagnóstico, consanguinidade e fenótipo bioquímico.

Tabela 1. Caracterização clínico demográfica dos pacientes com PKU da Bahia avaliados neste estudo.

Variáveis	Número de Pacientes	Frequência (%)
Sexo		
Masculino	46	43,4
Feminino	60	56,6
Idade (anos)		
0-5	19	18
6-11	32	30,1
12-17	33	31,1
18-23	10	9,5
24-29	4	3,8
30-55	8	7,5
Forma de diagnóstico		
Triagem Neonatal	90	84,9
Tardio	16	15,1
Relatos de Consanguinidade		
Sim	35	33
Não	71	67
Fenótipo Bioquímico		
PKU Clássica	73	68,9
PKU Leve	33	31,1
Total	106	100

Os indivíduos investigados foram oriundos de 63 municípios baianos. A maioria, 62,3% (66) concentrou-se nas mesorregiões metropolitana de Salvador, nordeste e centro norte do estado. As mesorregiões centro sul e sul contribuíram com 26,4% dos pacientes, enquanto as mesorregiões do vale sanfranciscano e extremo oeste corresponderam a 11,3% dos indivíduos (Tabela 2). Monte Santo, localizado no nordeste da Bahia, foi o município com maior representatividade de casos (11 pacientes), constatando que nessa região há um *cluster* de PKU, dada sua frequência bastante elevada quando comparada com o restante do estado da Bahia. Considerando o tamanho da população de 52.360 habitantes (IBGE, 2010), a incidência estimada pelo número de casos investigados de Monte Santo foi de 1:4.800. Em todo o estado da Bahia, a incidência observada é de 1:16.334 (AMORIM *et al.*, 2011).

Tabela 2. Distribuição geográfica dos pacientes com PKU nas mesorregiões da Bahia

Mesorregião (Nº de municípios da mesorregião)	Nº de municípios com pacientes diagnosticados	Nº de pacientes com PKU na mesorregião
Metropolitana de Salvador (38)	7	24
Nordeste (60)	12	24
Centro Norte (80)	12	18
Centro Sul (118)	13	17
Sul (70)	9	11
Vale Sanfranciscano (27)	5	7
Extremo Oeste (24)	5	5
Total	63	106

A investigação molecular das amostras dos pacientes pela metodologia de triagem mutacional por PCR/RFLP permitiu identificar 202 do total de 212 alelos, o que correspondeu a 95,2% da amostra. Com a triagem inicial das sete mutações escolhidas foi possível genotipar completamente 97 pacientes (91,5%). Para os nove pacientes (8,5%) que não tiveram seu genótipo estabelecido, realizou-se sequenciamento completo dos 13 éxons do gene *PAH*, o qual conseguiu concluir a genotipagem completa de toda amostra investigada.

Considerando a amostra total, a mutação IVS10-11G>A foi a mais frequente (25,6% dos alelos), seguida da p.V388M (23,2%) e p.R252W (17%). As mutações p.R408W, p.R176L, p.R249F e p.R241C, sendo as três últimas encontradas através do sequenciamento, corresponderam a pouco mais de 2% dos alelos da amostra estudada. A distribuição relativa das demais mutações detectadas encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição alélica das mutações encontradas no presente estudo.

Mutação	Localização no PAH	N (frequência %)
IVS10-11G>A	Éxon 11	54 (25,6)
p.V388M	Éxon 11	49 (23,2)
p.R252W	Éxon 7	36 (17)
p.I65T	Éxon 3	31 (14,7)
p.R261Q	Éxon 7	24 (11,4)
p.R261X	Éxon 7	6 (2,8)
p.E390G	Éxon 11	4 (1,8)
p.D84Y	Éxon 3	3 (1,4)
p.R408W	Éxon 12	2 (0,9)
p.L249F	Éxon 7	1 (0,4)
p.R241C	Éxon 7	1 (0,4)
p.R176L	Éxon 6	1 (0,4)
Total		212 (100)

As mutações IVS10-11G>A e p.V388M foram as mais encontradas em 5 das 7 mesorregiões (vale sanfranciscano e metropolitana de Salvador com a IVS10-11G>A como a mais frequente; já no extremo oeste e centro norte, a mais frequente foi a p.V388M). Na mesorregião centro sul, essas duas mutações foram encontradas de maneira equivalente. Na mesorregião sul, a mutação mais frequente foi a p.I65T, enquanto que na mesorregião nordeste, a p.R252W foi a mais encontrada, principalmente por conta do município de Monte Santo, responsável por 21 dos 24 alelos com esta mutação na região. A figura 1 mostra a distribuição geográfica e as frequências das mutações nas mesorregiões da Bahia.



Figura 1. Distribuição das mutações mais frequentes nas mesoregiões da Bahia (em parênteses está a frequência da mutação mais prevalente).

As mutações encontradas no estudo revelaram 25 genótipos distintos, sendo a maioria dos pacientes (52,8%) com genótipo heterozigoto composto. A mutação IVS10-11G>A foi a mais frequente, porém, o genótipo em homozigose (IVS10-11G>A/IVS10-11G>A) foi o terceiro mais encontrado, superado pelo p.R252W/p.R252W e pelo p.V388M/p.V388M, que foi mais frequente. O genótipo heterozigoto composto mais encontrado foi o IVS10-11G>A/p.I65T (10,38%). A distribuição dos genótipos na amostra estudada bem como suas frequências encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição dos genótipos dos pacientes com PKU investigados.

Genótipos	Éxons do PAH	N (frequência %)
p.V388M/p.V388M	Éxon 11/ Éxon 11	15 (14,18)
p.R252W/p.R252W	Éxon 7/ Éxon 7	13 (12,27)
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	Éxon 11/ Éxon 11	8 (7,55)
p.I65T/p.I65T	Éxon 3/Éxon 3	6 (5,67)
p.R261Q/p.R261Q	Éxon 7/Éxon 7	5 (4,71)
p.R261X/p.R261X	Éxon 7/Éxon 7	2 (1,88)
p.D84Y/p.D84Y	Éxon 3/Éxon 3	1 (0,94)
IVS10-11G>A/p.I65T	Éxon 11/Éxon 3	11 (10,38)
IVS10-11G>A/p.V388M	Éxon 11/ Éxon 11	10 (9,44)
IVS10-11G>A/p.R261Q	Éxon 11/Éxon 7	7 (6,63)
R261Q/p.V388M	Éxon 7/Éxon 11	5 (4,71)
p.I65T/p.R252W	Éxon 3/Éxon 7	4 (3,77)
IVS10-11G>A/p.R252W	Éxon 11/Éxon 7	3 (2,83)
p.I65T/p.E390G	Éxon 3/Éxon 11	2 (1,88)
IVS10-11G>A/p.R261X	Éxon 11/Éxon 7	2 (1,88)
IVS10-11G>A/p.R408W	Éxon 11/ Éxon 12	2 (1,88)
p.V388M/p.I65T	Éxon 11/Éxon 3	2 (1,88)
IVS10-11G>A/p.D84Y	Éxon 11/Éxon 3	1 (0,94)
IVS10-11G>A/p.R176L	Éxon 11/Éxon 6	1 (0,94)
IVS10-11G>A/p.R241C	Éxon 11/Éxon 7	1 (0,94)
p.R252W/p.E390G	Éxon 7/Éxon 11	1 (0,94)
p.R252W/p.R261Q	Éxon 7/Éxon 7	1 (0,94)
p.R261Q/p.E390G	Éxon 7/Éxon 11	1 (0,94)
p.V388M/p.L249F	Éxon 11/Éxon 7	1 (0,94)
p.R252W/p.V388M	Éxon 7/Éxon 11	1 (0,94)
Total		106 (100)

A partir dos valores de Phe ao diagnóstico e utilizando o sistema de predição do fenótipo proposto por Guldberg e colaboradores (GULDBERG *et al.*, 1998), além dos dados do BIOPKU *database*, foi possível classificar a amostra estudada em relação ao fenótipo observado, e depois comparar com o fenótipo previsto estabelecido pelos genótipos.

Nessa correlação genótipo-fenótipo (Tabela 5), observou-se que em 48,1% (51/106) dos indivíduos, houve completa correlação entre o fenótipo previsto e o observado. Esta

correlação foi mais frequente entre os genótipos heterozigotos compostos (48,2%) e entre os casos de PKU clássica (78,1%).

Tabela 5. Correlação genótipo-fenótipo dos pacientes com PKU na Bahia.

Genótipos	Fenótipos Previstos	Fenótipos Observados de PKU clássica (n)	Fenótipos Observados de PKU leve (n)
p.R252W/p.R252W	PKU clássica	11	2
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	PKU clássica	6	2
p.R261X/p.R261X	PKU clássica	1	1
p.D84Y/p.D84Y	PKU clássica	1	0
IVS10-11G>A/p.R252W	PKU clássica	2	1
IVS10-11G>A/p.R261X	PKU clássica	2	0
IVS10-11G>A/p.R408W	PKU clássica	2	0
IVS10-11G>A/p.D84Y	PKU clássica	0	1
p.V388M/p.V388M	PKU moderada/leve	12	3
p.I65T/p.I65T	PKU moderada/leve	6	0
p.R261Q/p.R261Q	PKU moderada/leve	3	2
IVS10-11G>A/I65T	PKU moderada/leve	8	3
IVS10-11G>A/V388M	PKU moderada/leve	5	5
IVS10-11G>A/R261Q	PKU moderada/leve	4	3
R261Q/V388M	PKU moderada/leve	5	0
I65T/R252W	PKU moderada/leve	3	1
I65T/E390G	PKU moderada/leve	0	2
V388M/I65T	PKU moderada/leve	0	2
IVS10-11G>A/R176L	PKU moderada/leve	0	1
IVS10-11G>A/R241C	PKU moderada/leve	0	1
R252W/E390G	PKU moderada/leve	0	1
R252W/R261Q	PKU moderada/leve	1	0
R261Q/E390G	PKU moderada/leve	0	1
V388M/L249F	PKU moderada/leve	0	1
R252W/V388M	PKU moderada/leve	1	0
Total		73	33

Discussão

A PKU é uma doença com alta heterogeneidade molecular, tendo sido descritas até o momento mais de 800 mutações no gene *PAH* (www.pahdb.mcgill.ca). Este trabalho propôs identificar mutações em pacientes com PKU acompanhados no SRTN/BA, a partir da triagem molecular inicial das sete mutações (p.R252W, p.R261Q, p.R408W, p.I65T, IVS10-11G>A, p.V388M e p.R261X) mais frequentemente descritas em estudos brasileiros anteriores (ACOSTA *et al.*, 2001; SANTANA-DA-SILVA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008), seguida de sequenciamento do gene *PAH*, para concluir a genotipagem. Finalmente, realizou-se correlação genótipo-fenótipo.

Mais de 90% dos pacientes acompanhados no SRTN/BA participaram da investigação, fazendo com que os dados apresentados neste trabalho forneçam uma visão ampla a cerca dos pacientes com PKU no estado da Bahia. Os resultados encontrados demonstram que o conjunto de mutações analisadas pode constituir uma boa opção para a análise inicial do gene *PAH* em pacientes com PKU na Bahia.

Observou-se nesta amostra uma prevalência maior de pacientes do sexo feminino (56,6%), mas não reflete uma característica da doença, pois a PKU apresenta padrão de herança autossômica recessiva, em que ambos os sexos possuem a mesma probabilidade de serem afetados. A maioria dos pacientes (84,9%) teve seu diagnóstico obtido através da triagem neonatal (teste do pezinho) e 16 (15,1%) foram casos identificados através de suspeita clínica, refletindo a melhor cobertura do teste do pezinho nos últimos anos (AMORIM, 2010). Todos os indivíduos diagnosticados tardiamente apresentaram sinais e sintomas da doença, sendo os mais frequentes a irritabilidade, descrita principalmente como dificuldade para dormir e se alimentar, além de choro frequente, o que reforça a importância do diagnóstico precoce para que o paciente receba o tratamento adequado, sem apresentação das manifestações clínicas da PKU.

Setenta e três pacientes (68,9%) apresentaram fenótipo bioquímico de PKU clássica, ressaltando mais uma vez a importância do diagnóstico e tratamento precoces, visto que os sinais e sintomas desses pacientes são mais graves caso não sejam diagnosticados, abandonem ou não cumpram a dieta. A média de idade na primeira consulta dos pacientes diagnosticados através da triagem neonatal foi de 46,9 dias, considerada elevada, uma vez que a recomendação é que o tratamento se inicie no primeiro mês de vida (BURGARD P., 2000).

A maioria dos indivíduos diagnosticados concentrou-se nas mesorregiões metropolitana de Salvador e nordeste, ambas com 24 afetados, tendo os municípios de Salvador, com 16 pacientes e Monte Santo, com 11, como as cidades responsáveis por essa maior concentração nas regiões citadas. O município de Monte Santo tem sido alvo de várias pesquisas em genética comunitária (ACOSTA, AX *et al.*, 2013), uma vez que concentra altas frequências de doenças genéticas, possivelmente associadas à taxa elevada de consanguinidade da população. De fato, observou-se neste trabalho, que 10 dos 11 afetados provenientes deste município relataram casos de consanguinidade, representando 28,6% (10/35) dos casos de consanguinidade toda amostra estudada. No Brasil, a taxa de consanguinidade é cerca de 15 vezes maior no Nordeste do que no Sul (BARROS, 2015).

A técnica de PCR/RFLP utilizada para pesquisa mutacional mostrou-se eficaz, visto que mais de 95% dos alelos da população estudada foram identificados através desta, tornando o sequenciamento necessário apenas para uma pequena quantidade das amostras (9). Tal porcentagem de detecção se deu por conta da escolha das 7 mutações para triagem inicial, podendo servir como base para estudos posteriores. Cinco mutações foram encontradas através do sequenciamento: p.E390G; p.D84Y; p.R176L; p.L249F e p.R241C, as quais estão localizadas nos éxons 11, 3, 6 e 7, respectivamente.

As mutações IVS10-11G>A, p.V388M, p.R252W e p.I65T representaram mais de 80% dos alelos identificados, ratificando dados de trabalhos anteriores realizados no nordeste do Brasil (AMORIM, 2010). Tal resultado reforça a evidência da maior homogeneidade no nordeste do país, incluindo o estado da Bahia, visto que estudos em outros estados e regiões do país houve maior heterogeneidade alélica (ACOSTA *et al.*, 2001, SANTOS, *et al.*, 2006, VACCARO, 2008 e SANTANA *et al.*, 2012), podendo ser justificado pela baixa taxa de migração no Estado, onde diversos grupos populacionais vivem isolados.

As mutações IVS10-11G>A (presente em mais de 25% de todos os alelos estudados), p.V388M (23,2%), p.R252W (17%), p.I65T (14,7%) e p.R261Q (11,4%), são frequentes na Itália (GIANNATTASIO *et al.*, 2001) e na Península Ibérica - Portugal e Espanha (DESVIAT *et al.*, 1999 e RIVERA *et al.*, 1998). A IVS10-11G>A é a mutação mais frequente em Portugal e em toda a orla do Mediterrâneo (VILARINHO, 2006). A p.V388M teve sua maior frequência (21%) descrita em Minas Gerais (SANTOS *et al.*, 2006). Este estado faz fronteira com a Bahia, assim, as similaridades entre as frequências mutacionais podem sugerir históricos de colonização semelhantes entre os dois estados (CALLEGARI-JACQUES *et al.*, 2003; AMORIM, 2010).

A mutação p.R252W está relacionada com a forma grave da doença e apresentou elevada frequência no município de Monte Santo, correspondendo a um *cluster*, pois esteve presente em todos os pacientes estudados e em elevada frequência (95,4% - presente em 21 dos 22 alelos). Este achado contribuiu para que o genótipo p.R252W/p.R252W fosse o segundo mais frequente de toda amostra estudada. A detecção desta mutação na população de Monte Santo pode ser explicada pelo efeito fundador que, possivelmente, ocorreu através de imigrantes europeus que colonizaram o Brasil, pois a p.R252W possui origem europeia, proveniente da península ibérica (Portugal e Espanha), principais imigrantes europeus que colonizaram o Brasil. Entretanto, em apenas um estudo, avaliando população de ciganos Welsh da Eslováquia, sedentária e com altas taxas de consanguinidade, encontrou-se frequência tão elevada quanto a descrita no presente trabalho (KALANIN *et al.*, 1994). Assim como na população de Monte Santo, pode-se sugerir efeito fundador, associado à consanguinidade, como origem deste achado. Um estudo anterior de ancestralidade genética na cidade de Monte Santo mostrou maior contribuição europeia na formação de sua população, estimando-se proporção de ancestralidade europeia de 63,5% em 194 indivíduos residentes no município (MACHADO, 2012).

A mutação p.R408W, encontrada em apenas dois alelos da amostra, é mais comum na Alemanha (ZSCHOCKE, 2003). A mutação p.R261X, presente em apenas 2,8% das amostras, é frequente também na Península Ibérica (RIVERA *et al.*, 1998), na Itália (DIANZANI *et al.*, 1995) e apresenta frequência de quase 10% em indivíduos com PKU no sul do Brasil (SILVA *et al.*, 2003).

A mutação p.E390G esteve presente em apenas 1,8% dos pacientes (n=4) é bem descrita na população croata (ZSCHOCKE *et al.*, 2003) e descrita também em estudos no sul do Brasil (SILVA *et al.*, 2003). Outra mutação, encontrada em 1,4% das amostras (n=3), a p.D84Y é citada em algumas populações europeias e em estudos na região sudeste do Brasil (SANTOS *et al.*, 2008).

As demais mutações encontradas: p.L249F, descrita em estudos do sul do Brasil (CEOLATO, J.C, 2011) e Portugal (VILARINHO L., 2006); p.R241C, frequente em populações asiáticas (MAO XM *et al.*, 2014; KIBAYASHI M *et al.*, 1998) e p.R176L, descrita em estudos na Espanha (DESVIAT LR, 1999) representaram, juntas, 1,2% da amostra.

As elevadas frequências das mutações predominantes na Península Ibérica (especialmente IVS10-11G>A, p.V388M, p.R261Q e p.I65T) estão relacionadas com os fatos históricos da colonização brasileira, evidenciando a grande influência desses países na formação populacional brasileira, em especial nordestina, onde a entrada de outros imigrantes

européus não ibéricos foi menos significativa do que em outras regiões do país (AMORIM, 2010). Populações como a portuguesa e espanhola contribuíram de maneira significativa na formação da população da Bahia (MACHADO, 2012) e esse fato se refletiu em relação à distribuição geográfica das mutações, onde ficou evidente a prevalência de duas (IVS10-11G>A e p.V388M – mais frequentes em 5 das 7 mesorregiões). Tais mutações são frequentes em populações europeias, principalmente na região da península ibérica.

Apenas nas mesorregiões sul e nordeste, as mutações IVS10-11G>A e p.V388M não foram as mais frequentes. Na mesorregião sul, a p.I65T (uma das mutações mais frequentes na região da Península Ibérica e da Itália e identificada como a mais frequente na população sul do Brasil) foi a mais frequente (RIVERA *et al.*, 1998; DIANZANI *et al.*, 1995, SILVA *et al.*, 2003). Na região nordeste da Bahia, a mutação mais frequente foi a p.R252W (principalmente por conta do município de Monte Santo, responsável por 21 dos 24 alelos com esta mutação na região).

As doze diferentes mutações encontradas na amostra estudada levaram à detecção de 25 genótipos. Destes, 47,2% foram homozigotos, podendo ser resultado dos altos níveis de consanguinidade nas populações do nordeste do Brasil, incluindo a Bahia (no presente estudo, a taxa de consanguinidade foi de 31,13%), fato este justificado por questões culturais (AZEVEDO *et al.*, 1986; FREIRE-MAIA *et al.*, 1989; FREIRE-MAIA *et al.*, 1990; AMORIM *et al.*, 2011), além do fato de alguns municípios baianos, principalmente interioranos, incluindo Monte Santo, serem divididos em povoados (favorecendo os casamentos endogâmicos) e terem uma baixa taxa de migração (MACHADO, 2012), o que também favorece ao aumento da taxa de consanguinidade. Além disso, no Brasil, a intensidade da endogamia aumenta do litoral para o interior (FREIRE-MAIA, 1957) e a região nordeste apresenta os maiores coeficientes de endogamia do país (BARROS, 2015). A principal consequência de casamentos consanguíneos é o aumento do risco de aparecimento de doenças autossômicas recessivas (RAFIEE *et al.*, 2010). Por isso, este tipo de casamento é frequentemente investigado em famílias com doenças recessivas (KHLAT *et al.*, 1991; BITTLES *et al.*, 1993; TUNCBILEK & KOC, 1994; STOLTENBERG *et al.*, 1999; BITTLES, 2001; SAADAT & ZENDEH-BOODI, 2006; SAADAT, 2005, 2007, 2008; TADMOURI *et al.*, 2009, MACHADO, 2012).

A análise da correlação genótipo/fenótipo da amostra mostrou que em 48,1% (51/106) dos indivíduos houve completa correlação entre o fenótipo previsto e o observado. Esta correlação foi mais frequente entre os genótipos heterozigotos compostos (48,2%) e entre os casos de PKU clássica (78,1%). A maioria das distorções entre o fenótipo previsto e o

observado ocorreu quando o fenótipo esperado seria o moderado/leve, porém o encontrado foi PKU clássica. Isso pode ter ocorrido porque as mutações não se apresentaram em conjunto a atividade enzimática residual esperada, como observado por Bercovich *et al.*, 2008 e Santos *et al.*, 2012.

Diversos estudos (KAYAALP *et al.*, 1997; SCRIVER *et al.* 2001 e SANTOS *et al.*, 2006) mostram que o genótipo não é capaz de prever adequadamente o fenótipo bioquímico da PKU. Fatores como absorção intestinal, taxa de depuração hepática e influência de outros genes parecem estar envolvidos no processo. Neste estudo, os genótipos encontrados para PKU foram capazes de prever adequadamente o fenótipo em 48,1% dos casos e em relação à quantidade de genótipos, houve correlação positiva em 10 dos 25 genótipos da amostra.

Boa parte dos índices de correlação genótipo-fenótipo ocorreu entre os pacientes com PKU clássica e isto reveste-se de especial importância, pois ratifica o fato de que a presença de uma mutação grave reflita em um fenótipo mais grave da doença, tornando a predição do fenótipo mais segura (OKANO *et al.*, 1991).

Conclusão

Os resultados encontrados demonstram que o conjunto de mutações analisadas pode constituir uma boa opção para a análise inicial do gene *PAH* em pacientes com PKU na Bahia.

A frequência de pacientes com mutações em homozigose (47,2%) provavelmente é resultado dos altos níveis de consanguinidade nas populações do nordeste do Brasil, incluindo a Bahia.

A mutação p.R252W apresentou elevada frequência no município de Monte Santo e cidades vizinhas, sugerindo efeito fundador. Estudos de haplótipos poderão ser úteis para relacionar origem dessa mutação. As elevadas frequências das mutações predominantes na Península Ibérica (especialmente IVS10-11G>A, p.V388M, p.R261Q e p.I65T) corroboram com os fatos históricos da colonização, evidenciando a grande influência desses países na formação populacional brasileira.

Os resultados apresentados permitirão sugerir estratégias mais simples e menos onerosas de triagem mutacional para PKU na Bahia e nos demais estados do nordeste do Brasil, o que será importante para a confirmação diagnóstica e eventual escolha e otimização do tratamento.

O estudo de correlação entre o fenótipo previsto pelo genótipo e o fenótipo observado pode facilitar a avaliação clínica dos pacientes, assim como fornecer evidências que auxiliem a escolha do tratamento mais adequado ao caso. Entretanto, esta correlação não é absoluta, e outras avaliações, como acompanhamento clínico, testes de tolerância e de sobrecarga de Phe devem ser realizados, no intuito de definir a melhor conduta a ser adotada em cada caso.

Referências Bibliográficas

ACOSTA, A. X. et al. Delivering genetic education and genetic counseling for rare diseases in rural Brazil. **Journal of genetic counseling**, v. 22, n. 6, p. 830-834, 2013.

ACOSTA, A. X. et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria. **Human mutation**, v. 17, n. 2, p. 122-130, 2001.

AMORIM, Tatiana et al. Aspectos clínicos da fenilcetonúria em serviço de referência em triagem neonatal da Bahia Clinical aspects of phenylketonuria in a reference service for neonatal screening in Bahia. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 5, n. 4, p. 457-462, 2005.

AMORIM, Tatiana et al. Clinical and demographic aspects of phenylketonuria in Bahia State, Brazil. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 29, n. 4, p. 612-617, 2011.

AZEVÊDO, Eliane S. et al. Mating types in a mixed and multicultural population of Salvador, Brazil. **Revista brasileira de genética**, v. 9, n. 3, p. 487-96, 1986.

BARROS, Josefa Andreza Cantalice. Perfil epidemiológico dos pacientes com mucopolissacaridose tipo IV-A na Paraíba. 2015.

BERCOVICH, Dani et al. Genotype–phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. **Journal of human genetics**, v. 53, n. 5, p. 407, 2008.

BITTLES, Alan H.; GRANT, Jonathan C.; SHAMI, Sajjad A. Consanguinity as a determinant of reproductive behaviour and mortality in Pakistan. **International journal of epidemiology**, v. 22, n. 3, p. 463-467, 1993.

BITTLES, Alan H. Consanguinity and its relevance to clinical genetics. **Clinical genetics**, v. 60, n. 2, p. 89-98, 2001.

BURGARD, Peter. Development of intelligence in early treated phenylketonuria. **European journal of pediatrics**, v. 159, n. 2, p. S74-S79, 2000.

CARRARO, Dirce Maria; KITAJIMA, João Paulo. Sequenciamento e bioinformática de genomas bacterianos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 28, p. 16-20, 2002.

CEOLATO, Juliana Casagrande et al. Distribuição de mutações comuns no gene da PAH em pacientes com fenilcetonúria do sul do Brasil. **Revista HCPA. Porto Alegre**, 2010.

DESVIAT, Lourdes R. et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH 4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. **Molecular genetics and metabolism**, v. 83, n. 1, p. 157-162, 2004.

FIEGE, Betina; BLAU, Nenad. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria. **The Journal of pediatrics**, v. 150, n. 6, p. 627-630, 2007.

FREIRE MAIA, Newton. Casamentos consanguíneos no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, n. 4, p. 863-6, 1990.

FREIRE MAIA, Newton. Pequena história dos estudos sobre uniões consanguíneas, com exemplos de populações brasileiras. **Ciência e cultura. (São Paulo)**, v. 41, n. 5, p. 483-9, 1989.

FREIRE-MAIA, Newton. Inbreeding in Brazil. **American journal of human genetics**, v. 9, n. 4, p. 284, 1957.

GIANNATTASIO, Sergio et al. Genetic heterogeneity in five Italian regions: analysis of PAH mutations and mini haplotypes. **Human heredity**, v. 52, n. 3, p. 154-159, 2001.

GULDBERG, Per et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. **The American Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 1, p. 71-79, 1998.

KAYAALP, Emre et al. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. **The American Journal of Human Genetics**, v. 61, n. 6, p. 1309-1317, 1997.

KHLAT, Myriam; KHOURY, Muin. Inbreeding and diseases: demographic, genetic, and epidemiologic perspectives. **Epidemiologic reviews**, v. 13, n. 1, p. 28-41, 1991.

KIBAYASHI, Masahiro; NAGAO, Masayoshi; CHIBA, Shunzo. Mutation analysis of the phenylalanine hydroxylase gene and its clinical implications in two Japanese patients with non-phenylketonuria hyperphenylalaninemia. **Journal of human genetics**, v. 43, n. 4, p. 231, 1998.

MACHADO, Taisa Manuela Bonfim et al. **Migração, estrutura populacional, tipos de casamentos e doenças genéticas em Monte Santo-Ba**. 2012. Tese de Doutorado.

MAO, X. M. et al. Analysis of mutations in exon 7 of phenylalanine hydroxylase gene among children with phenylketonuria in Ningxia, China. **Zhongguo dang dai er ke za zhi= Chinese journal of contemporary pediatrics**, v. 16, n. 3, p. 259-262, 2014.

MARTINS, Ana Maria; FRANGIPANI, Beatriz Jurkiewicz; MICHELETTI, Cecília. Protocolo Brasileiro de Dietas: erros inatos do metabolismo. In: **Protocolo brasileiro de dietas: erros inatos do metabolismo**. 2006.

OKANO, Yoshiyuki et al. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 18, p. 1232-1238, 1991.

Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase (2018). Disponível em: <http://www.pahdb.mcgill.ca/>. [Acesso em maio 2018].

RAFIEE, Laleh; SAADAT, Mostafa. Prevalence of consanguineous marriages among Iranian Georgians. **Journal of biosocial science**, v. 43, n. 1, p. 47-50, 2011.

RIVERA, Isabel et al. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. **Journal of medical genetics**, v. 35, n. 4, p. 301-304, 1998.

SAADAT, Mostafa. Epidemiology and mortality of hospitalized burn patients in Kohkiluyeh va Boyer-Ahmad province (Iran): 2002–2004. **Burns**, v. 31, n. 3, p. 306-309, 2005.

SAADAT, Mostafa; ZENDEH-BOODI, Zahra. Correlation between incidences of self-inflicted burns and means of inbreeding coefficients, an ecologic study. **Annals of epidemiology**, v. 16, n. 9, p. 708-711, 2006.

SAIKI, Randall K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermo stable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SANGER, Frederick; NICKLEN, Steven; COULSON, Alan R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SORTE, Boa et al. **Estudo de bases moleculares de Fenilcetonúria no Nordeste do Brasil**. 2010. Tese de Doutorado.

DA SILVA, Luiz Carlos Santana et al. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. **Molecular genetics and metabolism**, v. 79, n. 1, p. 17-24, 2003.

DOS SANTOS, Luciana Lara et al. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C, and IVS12nt1 in Minas Gerais, Brazil. **Genetic and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 16-23, 2006.

DE SANTANA SANTOS, Emerson et al. Genetic and clinical characterization of patients with phenylketonuria in Alagoas state, Brazil [Abstract in English]. **Scientia Medica**, v. 22, n. 2, p. 64-70.

SCRIVER, Charles R. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. **The metabolic & molecular bases of inherited disease**, p. 1667-1724, 2002.

STOLTENBERG, Camilla et al. Consanguinity and recurrence risk of stillbirth and infant death. **American Journal of Public Health**, v. 89, n. 4, p. 517-523, 1999.

TADMOURI, Ghazi O. et al. Consanguinity and reproductive health among Arabs. **Reproductive health**, v. 6, n. 1, p. 17, 2009.

TUNCBILEK, E.; KOC, Ismet. Consanguineous marriage in Turkey and its impact on fertility and mortality. **Annals of human genetics**, v. 58, n. 4, p. 321-329, 1994.

VACCARO, Tamara da Silva. Identificação de mutações no gene da fenilalanina hidroxilase por PCR em tempo real. 2008.

VILARINHO, Laura et al. Fenilcetonúria revisitada. **Arquivos de Medicina**, v. 20, n. 5-6, p. 161-172, 2006.

ZSCHOCKE, Johannes. Phenylketonuria mutations in Europe. **Human mutation**, v. 21, n. 4, p. 345-356, 2003.

ZURFLÜH, Marcel R. et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **Human mutation**, v. 29, n. 1, p. 167-175, 2008.

5. MANUSCRITO 2– Responsividade à Tetrahydrobiopterina em Pacientes com Fenilcetonúria na Bahia

- Este artigo corresponde ao proposto nos objetivos 3.1.1; 3.2.4 e 3.2.5
- Situação do artigo: Aguardando novos dados do teste de responsividade para serem incorporados aos resultados.

Responsividade à Tetrahydrobiopterina em Pacientes com Fenilcetonúria na Bahia

Silva CAN¹, Amorim T^{2,3}, Leite MEQ^{2,4}, Santos LR⁴, Anjos RCS², Acosta AX^{1,4}.

¹Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM)/FIOCRUZ-BA; ²Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador; ³Universidade de Estado da Bahia; ⁴Universidade Federal da Bahia

Resumo

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença genética, de herança autossômica recessiva, caracterizada pelo aumento dos níveis séricos de fenilalanina (Phe), devido a um erro no processo de conversão da Phe em tirosina (Tyr), realizado pela enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Tal processo de conversão requer a ação do cofator da PAH, a tetrahydrobiopterina (BH4). Ao nascer, o indivíduo com PKU se apresenta normal, mas, com o passar dos meses, começam a aparecer sintomas como irritabilidade, eczemas, e deficiência intelectual. Bioquimicamente, a PKU pode ser classificada em PKU clássica, PKU leve e HPA não-PKU, sendo o tratamento necessário nas duas primeiras classificações. Apesar de a dieta restrita em Phe ser o padrão-ouro do tratamento da PKU, a dificuldade de adesão à mesma, principalmente na idade escolar e adolescência faz com que outras formas de tratamento sejam propostas e estudadas para melhor atender as necessidades dos pacientes. Estudos recentes tem demonstrado que a administração oral de tetrahydrobiopterina pode gerar redução dos níveis plasmáticos de Phe. O objetivo deste estudo foi identificar indivíduos com PKU leve ou clássica potencialmente responsivos ao BH4 e relacionar esses dados com os genótipos dos pacientes responsivos. Foram testados 64 pacientes, com taxa de responsividade de 29,7%, havendo concordância de 64,7% com a previsão fornecida pelo genótipo. A mutação p.V388M foi a mais frequente entre os indivíduos responsivos, estando presente em 32,3% dos alelos da amostra.

Palavras-chave: PKU, responsividade, BH4, genótipo

Responsiveness to Tetrahydrobiopterin in Patients with Phenylketonuria in Bahia

Silva CAN¹, Amorim T^{2,3}, Leite MEQ^{2,4}, Santos LR², Anjos RCS², Acosta AX^{1,4}.

¹Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM)/FIOCRUZ-BA; ²Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador; ³Universidade de Estado da Bahia; ⁴Universidade Federal da Bahia

Abstract

Phenylketonuria (PKU) is a genetic disease with an autosomal recessive inheritance, characterized by an increase in serum phenylalanine (Phe) levels due to an error in the conversion of Phe to tyrosine (Tyr), performed by the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH). Such a conversion process requires the action of the PAH cofactor, tetrahydrobiopterin (BH4). At birth, the individual with PKU appears normal, but as the months go by, symptoms such as irritability, eczema, and intellectual disability begin to appear. Biochemically, PKU can be classified into classical PKU, light PKU and non-PKU HPA, being the treatment required in the first two classifications. Although the Phe-restricted diet is the gold standard of PKU treatment, the difficulty of adherence to PKU, especially in school age and adolescence, causes other forms of treatment to be proposed and studied to better meet the needs of patients. Recent studies have shown that oral administration of tetrahydrobiopterin may lead to reduced Phe plasma levels. The aim of this study was to identify individuals with mild or classical PKU potentially responsive to BH4 and to relate these data to responsive patient genotypes. Sixty-six patients were tested, with a response rate of 29.7%, with a 64.7% agreement with the prediction provided by the genotype. The p.V388M mutation was the most frequent among the responsive individuals, being present in 32.3% of the alleles of the sample.

Keywords: PKU, responsiveness, BH4, genotype

Introdução

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença genética, de herança autossômica recessiva, caracterizada pelo aumento dos níveis séricos de fenilalanina (Phe), devido a um erro no processo de conversão da Phe em tirosina (Tyr), realizado pela enzima fenilalanina hidroxilase (PAH). Tal processo de conversão requer a ação do cofator da PAH, a tetrahidrobiopterina (BH₄). Ao nascer, o indivíduo com PKU se apresenta normal. Alguns sintomas como irritabilidade, eczema e odor característico na urina podem ser observados no início da vida. A manifestação clínica mais importante é a deficiência intelectual (NYHANET *et al.*, 1998). Bioquimicamente, a PKU pode ser classificada em PKU clássica, PKU leve e HPA não-PKU. Na PKU clássica a concentração de Phe sérica ao diagnóstico é acima de 20mg/dL (1200µmol/L) e a atividade estimada da PAH menor que 1%, sendo necessário tratamento dietético imediato. A PKU leve apresenta níveis séricos de Phe entre 10 e 20mg/dL (600 e 1200µmol/L) com atividade enzimática residual estimada de 1 a 3%, e também necessita de tratamento precoce. Na HPA não-PKU, encontra-se atividade enzimática residual maior que 3%, o que leva a níveis séricos de Phe entre 4 e 10mg/dL (240 e 600µmol/L), insuficientes para levar a dano neurológico, não sendo necessário tratamento (KOCH & WENZ, 1987). O nível sérico de Phe está diretamente relacionado ao grau de deficiência intelectual e lesão neurológica, que se associa, também, com a idade de início do tratamento (MARTINS *et al.*, 2006).

Apesar de a dieta restrita em Phe ser o padrão-ouro do tratamento da PKU, a dificuldade de adesão à mesma, principalmente na idade escolar e adolescência faz com que outras formas de tratamento sejam propostas e estudadas para melhor atender as necessidades dos pacientes (MITCHELL; SCRIVER, 2010). Entre as opções de tratamento estão a suplementação de Large Neutral Amino Acids (LNAA): A suplementação de LNAA reduz os níveis de Phe no cérebro, visto que Phe, Tyr e outros aminoácidos competem pelo mesmo transportador (L-tyroaminoacid carrier) para ultrapassar a barreira hematoencefálica (WATER *et al.*, 2006; MITCHELL; SCRIVER, 2010). Terapia enzimática com fenilalanina amônia liase (PAL) pode ser útil para pacientes que possuem baixa ou nenhuma atividade enzimática da PAH. A PAL é uma enzima que não requer cofator e tem atividade sintética semelhante à PAH (MACDONALD; D'CUNHA, 2007). Terapia gênica: essa abordagem terapêutica consiste em introduzir um gene funcional recombinante no fígado de um indivíduo afetado para suprir a função do gene defeituoso. Tal abordagem necessita da clonagem da PAH que produza uma proteína funcional e um vetor que possa transferir este clone aos

hepatócitos. Os testes em animais mostraram-se eficazes a curto prazo, mas os efeitos terapêuticos não duram por muito tempo (EISENSMITH E WOO, 1996; KARAM, 2004).

Kure e colaboradores, em 1999 relataram os primeiros pacientes com PKU, cujos níveis plasmáticos de Phe diminuíram com a utilização oral de tetrahidrobiopterina (BH4) e, desde então, vários outros estudos, usando protocolos diferentes e doses variadas de BH4, demonstraram que pacientes com PKU podem ter os seus níveis de Phe melhor controlados mediante a administração oral de BH4 (FIEGE *et al*, 2005; LEVY HL *et al*, 2007; TREFZ FK *et al*, 2009). Os dados disponíveis sugerem que a presença ou ausência de responsividade ao BH4 é multifatorial, sendo o genótipo um dos seus fatores determinantes (ZURFLUH MR *et al*, 2009). A suplementação com administração de BH4: Segundo Burnett e colaboradores, a forma sintética oral do BH4, Sapropterindihidroclorato (Kuvan®) é uma terapia segura e eficaz em pacientes com PKU leve e moderada e também para alguns pacientes com a forma mais grave da doença, desde que os mesmos respondam positivamente aos testes de sobrecargas de Phe com Kuvan® (MITCHEL; SCRIVER, 2010; BLAU, 2014).

A genotipagem de pacientes com PKU pode auxiliar na identificação de potenciais respondedores ao tratamento com BH4. Estudos dos genótipos de pacientes responsivos indicam que a combinação de mutações do gene *PAH* é o indicador mais importante na responsividade ao BH4. Se duas mutações graves constituírem o genótipo do paciente, estando associadas com PKU clássica, muito possivelmente não haverá nenhuma atividade enzimática residual da PAH, tornando o paciente um possível não-responder ao BH4. Da mesma forma, pacientes com duas mutações leves podem ter alguma atividade residual e, possivelmente, podem responder ao tratamento com BH4 (BLAU E ERLANDSEN, 2004). Alguns pacientes com PKU clássica têm sido relatados como respondedores, mas todos eles têm pelo menos um alelo com uma mutação menos grave (MATALON *et al.*, 2004).

A determinação de pacientes potencialmente responsivos ao BH4 é feita, geralmente, através do teste de sobrecarga de Phe com administração de BH4 (MATALON, 2005) e uma série de protocolos já foi descrita.

O objetivo deste estudo foi identificar indivíduos com PKU leve ou clássica potencialmente responsivos ao BH4 e relacionar esses dados com os genótipos dos pacientes responsivos.

Materiais e Métodos

Foram incluídos no teste pacientes com fenótipo bioquímico de PKU leve ou clássica, maiores de cinco anos e em acompanhamento regular no SRTN-BA, sendo excluídos aqueles com presença de comorbidades não associadas à PKU. O critério idade deveu-se ao fato de o protocolo incluir uma etapa de sobrecarga com fenilalanina sintética e, como a maior parte do desenvolvimento cerebral ocorre até esta idade, considerou-se que abaixo de 5 anos haveria maior risco de dano neurológico durante o período de sobrecarga, motivo pelo qual optou-se por excluir as crianças em idade pré-escolar. O SRTN tem atualmente cerca de 140 pacientes com hiperfenilalaninemias em acompanhamento. Utilizando o critério faixa etária e ausência de comorbidades, 72 pacientes com PKU foram inicialmente elegíveis para o estudo. Três famílias recusaram participação no teste, e em quatro casos não foi possível aplicar o TCLE, pois o cuidador da criança não era o responsável legal. Sessenta e quatro pacientes foram testados, e um encontra-se agendado para teste. Os testes foram realizados entre abril de 2017 a maio de 2018.

Aos resultados do teste de responsividade, foram adicionados dados moleculares relativos aos genótipos dos pacientes, obtidos através de um estudo de triagem mutacional para pacientes com PKU no Estado da Bahia, bem como foi realizada a correlação genótipo-fenótipo dos indivíduos responsivos ao BH4. Foram adicionados também dados como tipo de diagnóstico e idade dos pacientes responsivos.

O teste consistiu das seguintes etapas: a) dieta padrão restrita em Phe mantida durante todo o teste (realizado em nível ambulatorial); b) sobrecarga medicamentosa, mediante a prescrição de Phe manipulada (100mg/kg/dia), no intuito de garantir seus níveis elevados para o teste de responsividade, sem ocasionar alterações potencialmente danosas no seguimento nutricional do paciente, e ao mesmo tempo garantir controle da ingesta de Phe, com vistas à melhor análise dos resultados. Esta administração foi iniciada nas 48 horas antecedentes ao teste e mantida por todo o teste. Coletas seriadas de sangue para dosagem de Phe pré-teste (níveis de Phe < 10mg/dL implicariam em adiamento do teste) em intervalos de 4 horas foram realizadas no terceiro dia de uso da sobrecarga de Phe (dia que antecedeu o início do uso de BH4); c) coleta de sangue para dosagem de Phe (T0) e administração do Kuvan® (20mg/kg) pela manhã, com coleta de amostras para dosagem de Phe após 8h (T1), 16h (T2), antes (T3) da 2ª administração de Kuvan® (24 horas após a primeira); d) última coleta após 24 horas (T4) da segunda dose de Kuvan®, momento em que se encerrou o teste, suspendendo a Phe medicamentosa e o Kuvan®. O quadro 1 detalha a metodologia do teste.

Quadro 1. Metodologia do teste de responsividade ao BH4.

Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
Administração de Phe sintética (100mg/Kg, via oral, dose única diária, mantendo dieta restrita em Phe)	Administração de Phe sintética (100mg/Kg, via oral, dose única diária, mantendo dieta restrita em Phe)	Coleta de sangue seco em papel filtro e dosagem de Phe, em intervalo de 4 horas, num total de 3 amostras Administração de Phe sintética (100mg/Kg, via oral, dose única diária, mantendo dieta restrita em Phe) Elegibilidade para o dia 4 dos pacientes que alcançarem níveis de Phe sérica iguais ou superiores a 10mg/dL	Administração de Phe sintética (100mg/Kg, via oral, dose única diária, mantendo dieta restrita em Phe) Administração de Cloridato de Sapropterina VO (20mg/Kg, dose única diária) Coleta de sangue seco em papel filtro e dosagem de Phe, em intervalos de 8 horas, durante 24 horas	Administração de Phe sintética (100mg/Kg, via oral, dose única diária, mantendo dieta restrita em Phe) Administração de Cloridato de Sapropterina VO (20mg/Kg, dose única diária) Coleta de sangue seco em papel filtro e dosagem de Phe no momento da administração do Cloridato de Sapropterina	Coleta de sangue seco em papel filtro e dosagem de Phe Suspensão de Cloridato de Sapropterina Suspensão de Phe sintética Encerramento do teste

Foram considerados potencialmente responsivos pacientes que obtiveram redução maior que 30% nos níveis de Phe. Este estudo obteve aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (número do parecer: 1.410.934 / 16/02/2016).

Resultados

Foram testados um total de 64 pacientes. O percentual de responsivos foi de 29,7%, o que correspondeu a 19 dos 64 pacientes testados. A maioria (52,6%) dos responsivos apresentou fenótipo bioquímico de PKU clássica. Obtiveram diagnóstico através da triagem neonatal 16 dos 19 pacientes responsivos, representando 84,2% dos mesmos. Pacientes do sexo feminino foram a maioria entre os responsivos, com 12 indivíduos, representando 63,1% da amostra.

Dados sobre o genótipo estavam disponíveis para 17 dos 19 pacientes responsivos. A mutação p.V388M foi a mais prevalente na composição dos genótipos dessas amostras (32,3%), seguida da IVS10-11G>A (23,5%) e p.R261Q (14,7%). A tabela 1 mostra as frequências das mutações dos pacientes responsivos. Oito pacientes (47%) possuíam genótipo homozigoto, sendo o p.V388M/p.V388M; IVS10-11G>A/IVS10-11G>A e p.R261Q/p.R261Q responsáveis por 87,5% (7/8) de todos os genótipos homozigotos.

Tabela 1. Distribuição alélica das mutações de 17 pacientes responsivos ao BH4.

Mutação	Localização no PAH	Frequência alélica (%) (n)
p.V388M	Éxon 11	32,37 (11)
IVS10-11G>A	Éxon 11	23,53 (8)
p.R261Q	Éxon 7	14,7 (5)
p.I65T	Éxon 3	8,82 (3)
p.R252W	Éxon 7	8,82 (3)
p.E390G	Éxon 11	5,88 (2)
p.L249F	Éxon 7	2,94 (1)
p.R241C	Éxon 7	2,94 (1)
Total		100 (34)

Em relação à correlação genótipo-fenótipo dos pacientes responsivos, observou-se que em 64,7% (11/17) dos indivíduos, houve completa correlação entre o fenótipo bioquímico previsto e o observado. Essa correlação foi mais frequente entre os casos de PKU clássica (75%) (3 correlações positivas em 4) , porém, a maioria dos genótipos previa fenótipos de PKU moderada/leve e, nesses casos, a correlação foi de 61,5% (8 correlações positivas em 13). A tabela 2 mostra a correlação genótipo-fenótipo dos pacientes responsivos ao BH4.

Já o quadro 2 mostra a comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com aqueles descritos na literatura a respeito da responsividade ao BH4 conforme o genótipo.

Tabela 2. Correlação genótipo-fenótipo dos pacientes responsivos ao BH4.

Genótipo	Fenótipo Previsto	Fenótipo observado
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	PKU clássica	PKU clássica
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A	PKU clássica	PKU clássica
p.R252W/p.R52W	PKU clássica	PKU clássica
IVS10-11G>A/p.R252W	PKU clássica	PKU leve
p.V388M/p.V388M	PKU moderada/leve	PKU clássica
p.V388M/p.V388M	PKU moderada/leve	PKU clássica
p.V388M/p.V388M	PKU moderada/leve	PKU clássica
p.R261Q/p.R261Q	PKU moderada/leve	PKU leve
p.R261Q/p.R261Q	PKU moderada/leve	PKU clássica
p.V388M/p.R261Q	PKU moderada/leve	PKU clássica
p.V388M/p.L249F	PKU moderada/leve	PKU leve
IVS10-11G>A/p.V388M	PKU moderada/leve	PKU leve
IVS10-11G>A/p.I65T	PKU moderada/leve	PKU leve
IVS10-11G>A/p.R241C	PKU moderada/leve	PKU leve
p.I65T/p.E390G	PKU moderada/leve	PKU leve
p.V388M/p.E390G	PKU moderada/leve	PKU leve
p.V388M/p.I65T	PKU moderada/leve	PKU leve

Quadro 2. Comparação dos genótipos de pacientes responsivos ao BH4 na Bahia com dados da literatura.

Genótipo (Nº de pacientes do presente estudo com o genótipo)	Taxa de responsividade ao BH4 conforme o genótipo* (nº de pacientes testados descritos)
p.V388M/p.V388M (3)	71,4% (14)
IVS10-11G>A/IVS10-11G>A (2)	5,61% (107)
p.R261Q/p.R261Q (2)	83,1% (74)
p.R252W/p.R252W (1)	Não associado à resposta (4)
IVS10-11G>A/p.R252W (1)	Não associado à resposta (3)
p.V388M/p.R261Q (1)	83,3% (6)
p.V388M/p.L249F (1)	Não associado à resposta (3)
IVS10-11G>A/p.V388M (1)	14,3% (7)
IVS10-11G>A/p.I65T (1)	25% (20)
IVS10-11G>A/p.R241C (1)	Sem dados
p.I65T/p.E390G (1)	100% (5)
p.V388M/p.E390G (1)	100% (11)
p.V388M/p.I65T (1)	93,75% (16)

*BH4 Databases [Internet]. BIOPKU : International Database of Patients and Mutations causing BH4-responsive HPA/PKU; 2005. Disponível em: <http://www.bh4.org/BH4DatabasesBiopku.asp>. Acesso: 01/07/2018

Discussão

Os dados do teste de responsividade ao BH4 revelaram as mutações p.V388M; IVS10-11G>A e p.R261Q como as mais frequentes entre os pacientes responsivos. A mutação p.V388M é bem relacionada à responsividade ao BH4 (TREFZ *et al.*, 2008), e foi encontrada em alta frequência na amostra do presente trabalho (32,3%). A mutação p.R261Q em homozigose tem uma resposta bastante eficiente ao BH4 (FIEGE *et al.*, 2005) e os 2 pacientes que apresentaram este genótipo no presente trabalho foram responsivos ao BH4. Em heterozigose, a p.R261Q parece não responder ao tratamento dependendo do outro alelo. Por exemplo: R261Q/I65T não responde, R261Q/V388M responde. Estas diferenças podem ser devidas ao nível de atividade residual prevista para o alelo, já que a I65T tem uma atividade residual prevista de, aproximadamente 23% e a V388M de 43% (FIEGE *et al.*, 2005).

A mutação IVS10-11G>A em heterozigose já foi associada com resposta ao BH4 (FIEGE *et al.*, 2005) e os 3 pacientes que apresentaram essa mutação em heterozigose responderam ao tratamento porém, em um estudo de 2004 nenhum genótipo que tinha como alelo integrante a mutação IVS10-11G>A respondeu ao fármaco (DESVIAT *et al.*, 2004). As razões para esta variabilidade de resposta não são conhecidas. Estudos têm sugerido que esta variabilidade possa ser devida a diferenças na absorção do BH4 (FIEGE *et al.*, 2003). A mesma indagação está presente em indivíduos responsivos que possuam a mutação p.R252W.

Os resultados mostraram que a maioria dos pacientes responsivos apresentou fenótipo bioquímico de PKU clássica, evidenciando que esses pacientes também podem ser responsivos ao teste de BH4. Como relatado na literatura (BLAU *et al.*, 2009), menos de 10% dos pacientes responsivos ao BH4 pertence ao grupo de PKU clássica. Isso se deve ao fato de que esses pacientes possuem atividade residual da PAH baixa ou até mesmo nula. Porém, segundo estudos clínicos, verificou-se que outros protocolos de longa duração são essenciais para detectar responsivos mais lentos (FIEGE *et al.*, 2005; BELANGER *et al.*, 2005; LEVY *et al.*, 2007). Fiege & Blau, 2007 observaram que um número elevado de pacientes com PKU clássica foram responsivos ao teste de sobrecarga com BH4, particularmente quando o indivíduo considerado responsivo obtivesse, ao invés de 30%, 20% de redução dos níveis de Phe sérica.

Em relação à correlação genótipo-fenótipo dos pacientes responsivos, observou-se que em 64,7% dos indivíduos, houve completa correlação entre o fenótipo previsto pelo genótipo e o fenótipo bioquímico observado. Dentre os casos nos quais o genótipo previa um fenótipo bioquímico de PKU moderada/leve, houve correlação positiva em 61,4% dos indivíduos, fato importante, visto que neste grupo de pacientes observa-se a maior frequência de responsividade ao tratamento com o BH4 descrito na literatura (BLAU *et al.*, 2003; DESVIAT *et al.*, 2004; FIEGE & BLAU, 2007; TREFZ *et al.*, 2008; ZURFLÜH *et al.*, 2008).

Os dados moleculares estão de acordo com o caráter multifatorial da responsividade ao BH4. Esse achado reforça que, apesar da genotipagem ser útil na predição da responsividade ao BH4, mais investigações são necessárias para que a mesma possa ser utilizada como teste definitivo para tanto (BLAU *et al.*, 2009).

O teste de responsividade ao BH4 de 48 horas é um teste de triagem para identificar pacientes que possam se beneficiar do uso de Kuvan®. O desafio atual consiste em saber quais modificações no estilo de vida dos pacientes, incluindo maior tolerância a proteína natural na dieta e menor uso de fórmula de aminoácidos isenta de fenilalanina, poderão ser incluídas, em cada caso. Para tanto, já se encontra em curso um novo estudo com expansão do teste para 28 dias, no intuito de estudar a tolerância dos pacientes em uso de Kuvan® à fenilalanina dietética.

Conclusão

Vários estudos têm como objetivo estudar a melhor utilização do BH4 para melhorar a qualidade de vida de pacientes com PKU, principalmente nas suas formas mais graves. O BH4 vem surgindo como uma nova terapia para esses pacientes, porém, ainda não existe um consenso sobre os melhores métodos e critérios para definir os pacientes responsivos, sendo necessários mais estudos.

Os potenciais benefícios do tratamento com BH4 para pacientes com PKU incluem a redução dos níveis de Phe no sangue e restrições dietéticas menos rigorosas, o que poderia levar a um aumento da adesão ao tratamento do paciente.

De acordo com os genótipos encontrados nos pacientes com PKU, 9 deles provavelmente responderiam ao tratamento com o BH4 de acordo com dados da literatura. Este resultado pode ser útil para o delineamento de estratégias de tratamento futuros para os indivíduos com PKU na Bahia.

Referências Bibliográficas

BLAU, Nenad; ERLANDSEN, Heidi. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **Molecular genetics and metabolism**, v. 82, n. 2, p. 101-111, 2004.

BLAU, Nenad et al. Optimizing the use of sapropterin (BH 4) in the management of phenylketonuria. **Molecular genetics and metabolism**, v. 96, n. 4, p. 158-163, 2009.

BLAU, Nenad; BERNEGGER, Caroline; TREFZ, Fritz K. Tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninaemia due to homozygous mutations in the phenylalanine hydroxylase gene. **European journal of pediatrics**, v. 162, n. 3, p. 196-196, 2003.

DESVIAT, Lourdes R. et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH 4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. **Molecular genetics and metabolism**, v. 83, n. 1, p. 157-162, 2004.

DOUGLAS, Teresa Dawn. **Impact of sapropterin (tetrahydrobiopterin, BH4) treatment, with and without diet liberalization, on monoamine status and quality of life in a phenylketonuria (PKU) cohort**. 2012. Tese de Doutorado. Emory University.

FIEGE, Betina; BLAU, Nenad. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria. **The Journal of pediatrics**, v. 150, n. 6, p. 627-630, 2007.

FIEGE, Betina et al. Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study. **Molecular genetics and metabolism**, v. 86, p. 91-95, 2005.

GIUGLIANI, Luciana et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness of patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. **Jornal de pediatria**, v. 87, n. 3, p. 245-251, 2011.

JÄGGI, Leandra et al. Outcome and long-term follow-up of 36 patients with tetrahydrobiopterin deficiency. **Molecular genetics and metabolism**, v. 93, n. 3, p. 295-305, 2008.

KURE, Shigeo et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **The Journal of pediatrics**, v. 135, n. 3, p. 375-378, 1999.

LEVY, Harvey L. Comments on final intelligence in late treated patients with phenylketonuria. **European journal of pediatrics**, v. 159, n. 14, p. S149-S149, 2000.

LEVY, Harvey L. et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. **The Lancet**, v. 370, n. 9586, p. 504-510, 2007.

MARTINS, Ana Maria; FRANGIPANI, Beatriz Jurkiewicz; MICHELETTI, Cecília. Protocolo Brasileiro de Dietas: erros inatos do metabolismo. In: **Protocolo brasileiro de dietas: erros inatos do metabolismo**. 2006.

MICHALS-MATALON, Kimberlee. Sapropterin dihydrochloride, 6-R-1-erythro-5, 6, 7, 8-tetrahydrobiopterin, in the treatment of phenylketonuria. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 17, n. 2, p. 245-251, 2008.

NYHAN, William L. Phenylalanine and Mental Retardation (PKU). **Abnormal States of Brain and Mind**, p. 88, 1989.

OKANO, Yoshiyuki et al. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 18, p. 1232-1238, 1991.

SANTOS, L. L. et al. Variations in genotype-phenotype correlations in phenylketonuria patients. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2010.

TREFZ, F. K. et al. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 32, n. 1, p. 22-26, 2009.

ZURFLÜH, Marcel R. et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **Human mutation**, v. 29, n. 1, p. 167-175, 2008.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foram investigadas as mutações presentes em pacientes com PKU na Bahia, diagnosticados pelo programa de triagem neonatal do Estado. Este estudo finaliza uma pesquisa iniciada em 2010, que teve por finalidade conhecer o perfil de mutações presentes nos pacientes com PKU da Bahia e em outros estados do Nordeste brasileiro.

A pesquisa teve ainda uma abrangência maior, fornecendo informações sobre como o genótipo se correlaciona com os fenótipos apresentados pelos pacientes da Bahia e, além disso, sobre os tratamentos alternativos que vêm surgindo nos últimos anos e os pacientes que respondem ao tratamento com o cofator BH4.

Com base nos resultados encontrados, podemos concluir que a população da Bahia possui um perfil de mutações mais homogêneo quando comparado ao perfil de outros estados. A maioria das mutações encontradas é de origem europeia, principalmente da Península Ibérica. Entretanto, a população do Estado, por ser fruto de um processo de miscigenação, possui também mutações que já foram descritas em populações asiáticas. A presença dessas mutações reflete a complexa mistura étnica presente em nosso país juntamente com as particularidades nas formas de povoamento do Estado.

O genótipo se mostrou um bom preditor do curso clínico da doença nos casos em que o paciente apresentava mutações associadas à forma grave da PKU. O sistema de predição pareceu ser bastante eficiente para os genótipos que possuíam dois alelos nulos, entretanto, para os genótipos com duas mutações com alguma atividade enzimática residual, o sistema de previsão pode ser falho, já que estes genótipos podem gerar fenótipos distintos.

Dados do teste de responsividade, juntamente com dados moleculares podem ser úteis para o delineamento de estratégias de tratamento futuros para os indivíduos com PKU.

Portanto, este trabalho contribuiu para o maior conhecimento da fenilcetonúria na Bahia, em todos os aspectos, seja ele molecular, populacional ou clínico.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. X. et al. Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Gene in Brazilian Patients with Phenylketonuria. **Human Mutation**, v. 17, p. 122-130, 2001.

ACOSTA, A. X. et al. Delivering Genetic Education and Genetic Counseling for Rare Diseases in Rural Brazil. **Journal of Genetic Counseling**, v. 20, p. PMID: 23338802, 2013.

AMORIM, T. et al. Genetics in the —Sertão: Study of frequent monogenic disorders in Monte Santo – a small city of the state of Bahia – northeastern Brazil. **Acta Bioquímica Latinoamericana**, supl 1, p.195, 2007.

AMORIM, T. R. S. **Estudo das Bases Moleculares da Fenilcetonúria no Nordeste do Brasil**. Tese. Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

AMORIM, T. et al. Aspectos clínicos da fenilcetonúria em serviço de referência em triagem neonatal da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 5, p. 457-462, 2005.

AMORIM, T.R.S. et al. Clinical and demographic aspects of phenylketonuria in Bahia state, Brazil. **Revista Paulista de Pediatria**, v.29, n. 4, p. 612-617, 2011.

AZEVÊDO, E. S. et al. Mating types in a mixed and multicultural population of Salvador, Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, n. 3, p. 487-496, 1986.

BERCOVICH, D. et al. Genotype-phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. **Journal Human Genetics**, v. 53, p. 407-418, 2008.

BITTLES, A. H.; GRANT, J. C.; SHAMI, S. A. An evaluation of consanguinity as a determinant of reproductive behavior and mortality in Pakistan. **International Journal Epidemiology**, v. 22, p. 463–467, 1993.

BITTLES, A.H. Consanguinity and its relevance to clinical genetics. **Clinical Genetics**, v. 60, p. 89–98, 2001.

BLAU, N.; ERLANDSEN, H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 82, n. 2, p. 101-111, 2004.

BLAU, N.; BERNEGGER, C.; TREFZ, F. K. Tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninaemia due to homozygous mutations in the phenylalanine hydroxylase gene. **European Journal of Pediatrics**, v. 162, n. 3, p. 196-196, 2003.

BURGARD, P. Development of intelligence in early treated phenylketonuria. **European Journal of Pediatrics**, v. 159, n. 2, p. S74-S79, 2000.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. et al. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, v. 15, n. 6, p. 824-834, 2003.

CARRARO, D. M.; KITAJIMA, J. P. Sequenciamento e bioinformática de genomas bacterianos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 28, p. 16-20, 2002.

CENTERWALL, S. A.; CENTERWALL, W. R. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. **Pediatrics**, v. 105, n. 1, p. 89-103, 2000.

CEOLATO, J. C. et al. Distribuição de mutações comuns no gene da PAH em pacientes com fenilcetonúria do sul do Brasil. **Revista HCPA**. Porto Alegre, 2010.

DA SILVA, L. C. S. et al. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 79, n. 1, p. 17-24, 2003.

DESVIAT, L. R. et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH 4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 83, n. 1, p. 157-162, 2004.

DOS SANTOS, L. L. et al. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, R408W, Y414C, and IVS12nt1 in Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 16-23, 2006.

DOUGLAS, T. D. **Impact of sapropterin (tetrahydrobiopterin, BH4) treatment, with and without diet liberalization, on monoamine status and quality of life in a phenylketonuria (PKU) cohort**. Tese (Doutorado) - Emory University, 2012.

FIEGE, B.; BLAU, N. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria. **The Journal of Pediatrics**, v. 150, n. 6, p. 627-630, 2007.

FIEGE, B.; BLAU, N. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria. **The Journal of Pediatrics**, v. 150, n. 6, p. 627-630, 2007.

FIEGE, B. et al. Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, p. 91-95, 2005.

FÖLLING, A. Excretion of phenylpyruvic acid in urine as a metabolic anomaly in connection with imbecility. **Nordisk Hygienisk Tidskrift**, v. 8, p. 1054-1059, 1934.

FREIRE MAIA, N. Casamentos consanguíneos no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, n. 4, p. 863-866, 1990.

FREIRE MAIA, N. Pequena história dos estudos sobre uniões consanguíneas, com exemplos de populações brasileiras. **Ciência e Cultura**, v. 41, n. 5, p. 483-489, 1989.

FREIRE-MAIA, N. Inbreeding in Brazil. **American Journal of Human Genetics**, v. 9, n. 4, p. 284, 1957.

GIUGLIANI, L. et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness of patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 3, p. 245-251, 2011.

GIANNATTASIO, S. et al. Genetic heterogeneity in five Italian regions: analysis of PAH mutations and minihaplotypes. **Human Heredity**, v. 52, n. 3, p. 154-159, 2001.

GUTHRIE, R.; BICKEL, H. The introduction of newborn screening for phenylketonuria. **European Journal of Pediatrics**, v. 155, p. S4-S5, 1996.

GUTHRIE, R.; SUSI, A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics**, v. 32, n. 3, p. 338-343, 1963.

GULDBERG, P. et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. **The American Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 1, p. 71-79, 1998.

JÄGGI, L. et al. Outcome and long-term follow-up of 36 patients with tetrahydrobiopterin deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 93, n. 3, p. 295-305, 2008.

Karam SM. Avaliação epidemiológica da triagem neonatal para fenilcetonúria no Rio Grande do Sul - 1986-2003: um estudo de coorte [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004

KALANIN, J. et al. Gypsy phenylketonuria: a point mutation of the phenylalanine hydroxylase gene in Gypsy families from Slovakia. **American Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 2, p. 235-239, 1994.

KAYAALP, E. et al. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. **The American Journal of Human Genetics**, v. 61, n. 6, p. 1309-1317, 1997. KHLAT, M.; KHOURY, M. Inbreeding and diseases: demographic, genetic, and epidemiologic perspectives. **Epidemiologic Reviews**, v. 13, n. 1, p. 28-41, 1991.

KIBAYASHI, M.; NAGAO, M.; CHIBA, S. Mutation analysis of the phenylalanine hydroxylase gene and its clinical implications in two Japanese patients with non-phenylketonuria hyperphenylalaninemia. **Journal of Human Genetics**, v. 43, n. 4, p. 231, 1998.

KOCH, R. et al. The maternal phenylketonuria international study: 1984–2002. **Pediatrics**, v. 112, Suppl. 4, p. 1523-1529, 2003.

KURE, S. et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **The Journal of Pediatrics**, v. 135, n. 3, p. 375-378, 1999

LEVY, H. L. Comments on final intelligence in late treated patients with phenylketonuria. **European Journal of Pediatrics**, v. 159, n. 14, p. S149-S149, 2000.

LEVY, H. L. et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. **The Lancet**, v. 370, n. 9586, p. 504-510, 2007.

MAO, X. M. et al. Analysis of mutations in exon 7 of phenylalanine hydroxylase gene among children with phenylketonuria in Ningxia, China. **Zhongguo dang dai er ke za zhi= Chinese Journal of Contemporary Pediatrics**, v. 16, n. 3, p. 259-262, 2014.

MARTINS, A. M.; FRANGIPANI, B. J.; MICHELETTI, C. Protocolo Brasileiro de Dietas: erros inatos do metabolismo. In: **Protocolo brasileiro de dietas: erros inatos do metabolismo**. 2006.

MICHALS-MATALON, K. Sapropterin dihydrochloride, 6-R-1-erythro-5, 6, 7, 8-tetrahydrobiopterin, in the treatment of phenylketonuria. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 17, n. 2, p. 245-251, 2008.

NYHAN, W. L. Phenylalanine and Mental Retardation (PKU). **Abnormal States of Brain and Mind**, p. 88, 1989

OKANO, Y. et al. Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 18, p. 1232-1238, 1991.

PENROSE, L.; QUASTEL, J. H. Metabolic studies in phenylketonuria. **Biochemical Journal**, v. 31, n. 2, p. 266, 1937.

PHENYLALANINE hydroxylase locus knowledgebase, 2018. Disponível em: <http://www.pahdb.mcgill.ca/>. Acesso em: maio 2018.

RAFIEE, L.; SAADAT, M. Prevalence of consanguineous marriages among Iranian Georgians. **Journal of Biosocial Science**, v. 43, n. 1, p. 47-50, 2011.

RIVERA, I. et al. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. **Journal of Medical Genetics**, v. 35, n. 4, p. 301-304, 1998.

SAADAT, M. Epidemiology and mortality of hospitalized burn patients in Kohkiluyeh va Boyer-Ahmad province (Iran): 2002–2004. **Burns**, v. 31, n. 3, p. 306-309, 2005.

SAADAT, M.; ZENDEH-BOODI, Z. Correlation between incidences of self-inflicted burns and means of inbreeding coefficients, an ecologic study. **Annals of Epidemiology**, v. 16, n. 9, p. 708-711, 2006.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, L. L. et al. Variations in genotype-phenotype correlations in phenylketonuria patients. **Genetics Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2010.

SCRIVER, C. R. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. **The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease**, p. 1667-1724, 2002.

SOARES, M. T. de O. Estimativa da consanguinidade e ocorrência de deficiências causadas por doenças genéticas em municípios da Paraíba. 2011. 25f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.

STOLTENBERG, C. et al. Consanguinity and recurrence risk of stillbirth and infant death. **American Journal of Public Health**, v. 89, n. 4, p. 517-523, 1999.

TADMOURI, G. O. et al. Consanguinity and reproductive health among Arabs. **Reproductive Health**, v. 6, n. 1, p. 17, 2009.

TEIGEN, K.; FRØYSTEIN, N. Å.; MARTÍNEZ, A. The structural basis of the recognition of phenylalanine and pterin cofactors by phenylalanine hydroxylase: implications for the catalytic mechanism¹. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 3, p. 807-823, 1999.

TREFZ, F. K. et al. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 32, n. 1, p. 22-26, 2009.

TUNCBILEK, E.; KOC, Ismet. Consanguineous marriage in Turkey and its impact on fertility and mortality. **Annals of Human Genetics**, v. 58, n. 4, p. 321-329, 1994.

Vaccaro TS. Identificação de mutações no gene da fenilalanina hidroxilase por PCR em tempo real. [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.

VILARINHO, L. et al. Fenilcetonúria revisitada. **Arquivos de Medicina**, v. 20, n. 5-6, p. 161-172, 2006.

ZSCHOCKE, J. Phenylketonuria mutations in Europe. **Human Mutation**, v. 21, n. 4, p. 345-356, 2003.

ZURFLÜH, M. R. et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **Human Mutation**, v. 29, n. 1, p. 167-175, 2008.

ANEXOS

Anexo 1 – Protocolos para PCR/RFLP

Mutação	Primers + PCR	Enzima de digestão	Mapa de Restrição
IVS10-11G>A	5' TGAGAGAAGGGGCACAAATG3' 5' GCCAACCACCCACAGATGAG3' Bf (1,5mM com 10% BSA) - 2,5uL dNTP (1,25mM) - 2,0uL P1+P2 (2,5mM cada) - 5,0uL Taq - 0,2uL 94°C – 6' 57 °C – 2' 72 °C -30'' } 95 °C -30'' } 35x 57 °C -1' } 72 °C -10' 4 °C -	Ddel Bf1x – 6uL Ddel - 0,5uL PCR - 6uL 37°C – 3horas	HMS – 301pb HMM - 223 e 78pb HET- 301, 223 e 78pb

Mutação	Primers + PCR	Enzima de digestão	Mapa de Restrição
p.V388M	5' TGAGAGAAGGGGCACAAATG3' 5' GCCAACCACCCACAGATGAG3' Bf (1,5mM com 10% BSA) - 2,5uL dNTP (1,25mM) - 2,0uL P1+P2 (2,5mM cada) - 5,0uL Taq - 0,2uL 94 °C – 6' 57 °C – 2' 72 °C -30'' } 95 °C -30'' } 35x 57 °C -1' } 72 °C -10'	BsaAI Bf1x – 6uL BsaAI - 0,5uL PCR - 6uL 37°C – 3horas	HMS – 187 e 114pb HMM - 301pb HET- 301, 187 e 114pb

Mutação	Primers + PCR	Enzima de digestão	Mapa de Restrição
p.I65T	5' TTAGTTCCTGTGACTGTCTC3' 5' AACGAGAAGGTCTAGATTCG3' Bf (1,5mM com 10% BSA) - 2,5uL dNTP (1,25mM) - 2,5uL P1+P2 (2,5mM cada) - 4,0uL Taq - 0,2uL 94 °C - 6' 53 °C - 2' 72 °C -30'' } 95 °C -30'' } 35x 53 °C -1' } 72 °C -10' 4 °C -	<i>TaqI</i> H2O - 2,5uL Bf10x - 2uL <i>TaqI</i> - 0,5uL PCR - 10uL 65°C - 3horas	HMS - 72 e 20pb HMM - 92pb HET- 92, 72 e 20pb

Mutação	Primers + PCR	Enzima de digestão	Mapa de Restrição
p.R261Q	5' GGTGATGAGCTTTTAGTTTTCTTTC3' 5' AGCAAATGAACCCAAACCTC3' Bf (1,5mM com 10% BSA) - 2,5uL dNTP (1,25mM) - 2,0uL P1+P2 (2,5mM cada) - 4,0uL Taq - 0,2uL 94 °C - 6' 59 °C - 2' 72 °C -30'' } 95 °C -30'' } 35x 59 °C -1' } 72 °C -10' 4 °C -	<i>Hinfi</i> Bf - 6uL <i>Hinfi</i> - 0,5uL PCR - 6uL 37°C - 6horas	HMS - 147 e 116pb HMM - 263pb HET- 263, 147 E 116pb

Mutação	Primers + PCR	Enzima de digestão	Mapa de Restrição
p.R252W	5' GGTGATGAGCTTTTAGTTTTCTTTC3' 5' AGCAAATGAACCCAAACCTC3' Bf (1,5mM com 10% BSA) - 2,5uL dNTP (1,25mM) - 2,0uL P1+P2 (2,5mM cada) - 4,0uL Taq - 0,2uL 94 °C - 6' 59 °C - 2' 72 °C -30'' } 95 °C -30'' } 35x 59 °C -1' } 72 °C -10' 4 °C -	AVAI Bf - 8uL AVAI- 0,5uL PCR - 8uL 37°C - 6horas	HMS - 177 e 86pb HMM - 263pb HET- 263, 177 e 86pb

Mutação	Primers + PCR	Enzima de digestão	Mapa de Restrição
p.R261X	5' GGTGATGAGCTTTTAGTTTTCTTTC3' 5' AGCAAATGAACCCAAACCTC3' Bf (1,5mM com 10% BSA) - 2,5uL dNTP (1,25mM) - 2,0uL P1+P2 (2,5mM cada) - 4,0uL Taq - 0,2uL 94 °C - 6' 59 °C - 2' 72 °C -30'' } 95 °C -30'' } 35x 59 °C -1' } 72 °C -10'	Ddel Bf - 6uL Ddel- 0,5uL PCR - 6uL 37°C - 6horas	HMS - 263pb HMM - 148 e 115pb HET- 263, 148 e 115pb

Mutação	Primers + PCR	Enzima de digestão	Mapa de Restrição
p.R408W	5'ATGCCACTGAGAACTCTCTT3' 5'GATTACTGAGAAACCGAGTGGCC3' Bf (1,5mM com 10% BSA) - 2,5uL dNTP (1,25mM) - 2,0uL P1+P2 (2,5mM cada) - 5,0uL Taq - 0,2uL 94 °C - 6' 59 °C - 2' 72 °C -30'' } 95 °C -30'' } 35x 59 °C -1' } 72 °C -10' 4 -	Styl Bf - 6uL Styl- 0,5uL PCR - 6uL 37°C - 6horas	HMS - 238pb HMM - 141 e 97pb HET- 238, 141 e 97pb

ANEXO 2– Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Implantação de uma Rede de Investigação das Hiperfenilalaninemias nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil

Pesquisador: Angelina Xavier Acosta

Área Temática: Genética Humana
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 44708615.1.1001.0049

Instituição Proponente: Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.410.934

Apresentação do Projeto:

As hiperfenilalaninemias (HPA), em especial, a Fenilcetonúria (PKU) estão entre os erros inatos do metabolismo (EIM) mais bem estudados, por fazerem parte de programas de triagem neonatal em todo o mundo. No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) garante o rastreamento, confirmação diagnóstica e tratamento desta condição em todo o país, através dos Serviços de Referência em Triagem Neonatal

(SRTN). Apesar do PNTN do estado da Bahia oferecer o diagnóstico bioquímico de PKU, a maioria das quantificações para acompanhamento dos níveis de fenilalanina e tirosina é encaminhada para as regiões sul e sudeste do país, realidade também observada nos outros SRTNs da região norte-nordeste. Além disso, a investigação molecular, através da detecção de mutações no gene da fenilalanina hidroxilase (PAH) não está prevista,

e existem poucos dados a este respeito na região norte (N) e nordeste (NE) do Brasil. Ademais, como o tratamento clássico para essa doença é baseada na dietoterapia que é complexa e de longa duração, a adesão ao tratamento torna-se mais difícil principalmente a partir da idade escolar. Sendo, assim, outras opções terapêuticas que também controlam os níveis de fenilalanina estão sendo sugeridas como a administração oral de tetrahidropterina (BH4). A responsividade

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

Página 01 de 06

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.410.934

a este tipo de tratamento parece ser multifatorial, sendo o genótipo um dos seus fatores determinantes. Ademais, como a principal sintomatologia dos pacientes com PKU não tratados é a deficiência intelectual (DI), assim como transtornos do espectro autista (TEA), triagens desse EIM em indivíduos com DI e TEA tornam-se a primeira etapa de investigação de desordens bioquímicas neste grupo de pacientes. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo implantar um centro especializado no diagnóstico e acompanhamento das HPA, no âmbito do SUS nas regiões N e NE, permitindo caracterizar os pacientes com HPA, quanto aos seus aspectos clínicos, demográficos, epidemiológicos, moleculares e de responsividade ao BH4; além de reavaliar pacientes com DI que não realizaram a triagem neonatal e podem estar diagnosticados erroneamente. Além disso, alguns trabalhos relataram que Transtornos do Espectro Autista (TEA) também foram associados ao PKU. Participação do estudo pacientes com diagnóstico confirmado de PKU provenientes da região Norte e Nordeste para a caracterização genotípica e avaliação da responsividade ao BH4. Além disso, serão selecionados pacientes com DI e TEA de alguns centros de Salvador-BA para avaliação de aminoacidopatias. O estabelecimento desta Rede envolvendo as regiões Norte e NE permitirá o acesso à investigação/acompanhamento de alta tecnologia de pacientes com HPA no SUS dessas regiões. Além disso, será possível estimar a frequência de HPA como causa de DI não diagnosticado e TEA, o que permitirá um estabelecimento de políticas específicas, visando não só a atenção adequada a esse grupo da população e às suas famílias, mas também o desenvolvimento de programas de prevenção garantindo atendimento adequado na área da genética clínica para a população geral. Por isso, a implantação de um centro colaborativo especializado no diagnóstico e acompanhamento em HPA será de fundamental importância para atender a demanda dessa população.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Implantar um centro colaborativo especializado no diagnóstico e acompanhamento das HPA no âmbito do SUS nas regiões NO e NE.

Objetivo Secundário:

• Determinar o perfil clínico e epidemiológico das HPA na população estudada; • Detectar mutações no gene da PAH em indivíduos com diagnóstico

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

Página 02 de 06

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.410.934

de HPA;

- Descrever a distribuição das mutações do gene da PAH nas regiões norte/nordeste brasileiras;
- Propor painel de mutações mais comuns em cada estado do nordeste e alguns estados do norte do Brasil, para avaliação individualizada;
- Definir as bases moleculares responsáveis pela HPA, disponibilizando técnicas de biologia molecular para os indivíduos procedentes dos estados das regiões NO e NE do Brasil.
- Identificar mutações potencialmente responsivas ao tratamento com o cofator tetrahidropterina (BH4);
- Testar a resposta bioquímica ao BH4 nos pacientes com mutações potencialmente responsivas a este fármaco;
- Comparar o nível de funcionamento intelectual e cognitivo de pacientes responsivos ao BH4 com grupo de pacientes com intervenção dietética apenas;
- Investigar HPA em pacientes com DI e TEA, atendidos no Serviço de Genética Médica do HUPES e do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Autismo (LABIRINTO) da Escola Bahiana de Medicina;
- Disponibilizar a cromatografia de aminoácidos por HPLC para os pacientes com DI e TEA cuja triagem para HPA tenha sido negativa, disponibilizando exame laboratorial de forma criteriosa e eficiente para diagnóstico de EIM atendendo à demanda dessas regiões que não dispõem dessa tecnologia no âmbito SUS, minimizando as desigualdades nacionais;
- Disponibilizar laboratórios equipados para pesquisas, auxiliando em projetos de pós-graduação, doutorados e mestrados, e graduação, iniciação científica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Como o projeto possui duas linhas diferentes de pesquisa. Para os participantes da pesquisa que forem incluídos na linha de DI e TEA, e também para os participantes com PKU os riscos estão associados com a coleta de sangue que incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados devem ser tomados para minimizar esses riscos. Somente os pacientes com PKU que participarem da avaliação de resposta ao BH4 podem ocorrer efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados.

Benefícios:

Para os participantes da pesquisa diagnosticados com PKU será possível implantar a nível SUS a identificação de mutações potencialmente responsivas ao tratamento com o cofator

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

Página 03 de 06

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.410.934

tetrahidropterina (BH4); além de ser possível para estes pacientes responsivos a este tipo de tratamento propor este protocolo no âmbito SUS, especialmente para aqueles pacientes com graves dificuldades em seguir a dietoterapia padrão. Já para os pacientes com DI e TEA será possível determinar a etiologia destas doenças, o que poderá beneficiar, e muito, o participante da pesquisa já que para as hiperfenilalaninemias existem tratamentos disponíveis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide conclusões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE e Termo de Assentimento adequados.

Recomendações:

Vide conclusões.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise do protocolo e do TCLE e do Termo de Assentimento postados posteriormente pelo Pesquisador, o CEP foi favorável a aprovação do protocolo.

Considerações Finais a critério do CEP:

O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

Página 04 de 06

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.410.634

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ____/____/____ e ao término do estudo.

Situação: Projeto Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	TCLE PKU.doc	12/08/2015 15:03:01		Postado
Outros	Termo de Assentimento Para Menores.doc	12/08/2015 15:02:42		Postado
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_482460.pdf	04/05/2015 12:56:29		Aceito
Outros	Equipe 2.jpg	04/05/2015 12:55:52		Aceito
Outros	Equipe.pdf	04/05/2015 12:54:58		Aceito
Outros	Carta Encaminhamento ao CEP.pdf	04/05/2015 12:54:21		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta Anuência Serviço de Genética.pdf	04/05/2015 12:53:54		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta Anuência FMJ.pdf	04/05/2015 12:53:38		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta Anuência Ceara.pdf	04/05/2015 12:53:24		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta Anuência APAE.pdf	04/05/2015 12:53:10		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta Anuência Bahiana.pdf	04/05/2015 12:52:59		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	04/05/2015 12:51:47		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE PKU.pdf	25/03/2015 10:30:19		Aceito

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

Página 05 de 05

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROF. EDGARD SANTOS-
UFBA - HUPES



Continuação do Parecer: 1.410.634

Justificativa de Ausência	TCLE PKU.pdf	25/03/2015 10:30:19		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CNPq Doenças Raras Angelina Xavier.pdf	25/03/2015 09:25:24		Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 16 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
REGINA SANTOS
(Coordenador)

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

Página 06 de 05