

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

**PPGBSMI – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde
e Medicina Investigativa**

TATIANA REGIA SUZANA AMORIM BOA SORTE

**ESTUDO DAS BASES
MOLECULARES
DA FENILCETONÚRIA NO
NORDESTE DO BRASIL**

Tese de Doutorado

Salvador
2010

TATIANA REGIA SUZANA AMORIM BOA SORTE

Estudo das Bases Moleculares da Fenilcetonúria no Nordeste do Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Saúde e Medicina Investigativa como parte do Pré-requisito para a obtenção do título de Doutor. Área de Concentração: Epidemiologia Molecular e Medicina Investigativa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angelina Xavier Acosta

Salvador
2010

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

B662e Boa Sorte, Tatiana Regia Suzana Amorim.
Estudo de bases moleculares de Fenilcetonúria no Nordeste do Brasil.
[manuscrito] / Tatiana Regia Suzana Amorim Boa Sorte. - 2010.
112 f. : il. ; 30 cm.

**Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de
Pesquisa**

Gonçalo Moniz. 2010.

Orientador: Profa. Dra. Angelina Xavier Costa, Laboratório Avançado
de Saúde Pública.

1. Fenilcetonúrias. 2. Triagem Neonatal. 3. Avaliação em Saúde. 4.
Genótipo. 5. Fenótipo. I.Título.

CDU 616-008.9:575.21/22

Dedico este trabalho a

*Adriete e Suelle, Adson, Alice, Aline, Ana Clara, Ana Paula, Ariane, Bastião, Lúcia e
Diane, Caíque, Camilly, Carlos Henrique, Cauã, Cícera, Cristiane, Daniel, David, Diego,
Dione, Edla, Edvan, Eilane, Elisama, Ellen e Mateus, Emerson e Geisa, Everton, Fabiana,
Fernanda, Filipe, Fran, Gabrielle, Gisele, Gleyce, Graziela, Gui, Gustavo O., Gustavo C.,
Henrique, Ingrid, Isabela, Jadson, Jefferson e Jaqueline, Jhully, Joaby, João Henrique,
Laércio, Laís, Lara, Lucas, Luiz Gabriel e Gustavo Luiz, Manuela, Marcelo, Marcos, Maria
Luiza, Marilane, Martinha, Matheus, Micaele, Michelle, Mirele, Naiara, Nicolas, Núbia e
Luiz, Pedro Venâncio, Pedro Victor, Pétula, Rafa, Raíra, Raissa e Wellington, Ryan,
Sabryna, Sarah, Stefanie, Tamires, Tarciso e Adailton, Thaíde, Vanessa, Vanessinha,
Venilson, Vivi, Welister, Wesley e Willian,*

bebês, crianças, adolescentes e adultos, “meninos e moleques” com fenilcetonúria,
inspiração para trabalhar com este tema, alegria em fazer um trabalho que vale a
pena, lembrança de que amostras de DNA são na verdade pessoas...

Agradecimentos

A Deus, onde tudo começa e termina;

A minha família, por ter suportado tantas ausências;

A minha orientadora, Angelina, por tudo o que me ensinou nestes longos anos;

A nossa “ori” de todos, Profa Kiyoko Abé-Sandes, por estar sempre presente para ajudar, orientar e “acalmar”;

Ao Laboratório Avançado de Saúde Pública, em especial ao Dr Bernardo Galvão, por ter me recebido, à Dra Fernanda Grassi, por ter me acolhido nas etapas finais do trabalho, e a D. Eugênia “Lindinha”, por seu apoio e eterna simpatia;

Ao muitíssimo querido Genlasp, nosso grupo de pesquisa, uma verdadeira família acessória. Agradecimentos especiais a “nossa professora” Taisa, pelo inestimável auxílio no sequenciamento, por nos ensinar sempre; a Taise, primeiro aluna, depois colega, sempre companheira; a Gabrielle, sempre disposta a ajudar no que precisarmos; e a Thais, pela ajuda, pelas conversas, pelo bom humor e pelo exemplo de vida. Realmente, eu não sei o que faria sem vocês... É realmente feliz quem tem amigos desta qualidade...;

A Filipe Rêgo, pela enorme ajuda na análise das sequências;

Ao pessoal do Centro de Diagnóstico e Pesquisa da APAE Salvador, pelo extraordinário apoio na realização deste trabalho. A toda equipe do atendimento, “interdisciplinar” na verdadeira acepção da palavra. Em especial a Jô, pelo cuidado todo especial com as coletas, a Simone, pela atenção que a caracteriza, a Rogério, pelo apoio sempre presente, à equipe de busca ativa, Alene, Ana Paula e Eugênia, pela disponibilidade constante em auxiliar na obtenção dos dados, e a Patrícia, parceira neste trabalho em várias etapas (na recepção, na busca ativa e agora no NUPEC). Agradecimentos muito especiais também a Neyla e Daniela, pelo auxílio na obtenção dos dados sociais, a Efigênia, pela participação constante, a Antônio, pela ajuda com os dados laboratoriais, a Helena, que me convidou para fazer parte deste maravilhoso grupo, a Inês, que oportunizou este trabalho, e a Cleuza, que apostou e vem apostando na pesquisa científica. Sem vocês todos, nada aconteceria...

Aos SRTN de Sergipe, Alagoas, Ceará, Maranhão e Piauí, em especial a Marta Magalhães, Emerson Santos e Alzira Rocha, Erlane Ribeiro e Juliana Rodovalho-

Doriqui, pelo gentil envio de amostras e dados clínicos de seus pacientes. E claro, a estes pacientes e suas famílias também;

Aos meus queridos alunos de iniciação científica, hoje todos já profissionais, que foram fundamentais neste processo: Sara, Fernandinho, Taise, Thessika e Kelly;

À FAPESB – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia, pelo suporte de bolsa de estudos e apoio a comparecimento em evento científico internacional;

À Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, pelo apoio à realização do doutorado;

E, finalmente, meu mais profundo e sincero agradecimento ao meu marido, Ney. Pelo seu carinho, pela sua paciência (mais ou menos...), pelo seu apoio, pelo seu estímulo, pela sua ajuda, pelo seu exemplo... Sem você, eu não conseguiria (pelo menos não tão bem!);

E a tantos outros que participaram positivamente da minha vida nestes anos, muito obrigada.

*Há um menino, há um moleque,
morando sempre no meu coração.
Toda vez que o adulto balança ele vem pra me dar a mão.
Há um passado no meu presente,
Um sol bem quente lá no meu quintal.
Toda vez que a bruxa me assombra
o menino me dá a mão.
E me fala de coisas bonitas
que eu acredito
que nunca deixarão de existir:
amizade, palavra, respeito, caráter, bondade, alegria e amor.
Pois não posso, não devo, não quero viver
como toda essa gente insiste em viver,
não posso aceitar sossegado qualquer sacanagem ser coisa normal.
Bola de meia, bola de gude,
O solidário não quer solidão.
Toda vez que a tristeza me alcança o menino me dá a mão...*

(Milton Nascimento/Fernando Brant)

RESUMO

As hiperfenilalaninemias (HPA), em especial a fenilcetonúria (PKU) estão entre os erros inatos do metabolismo 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). O PNTN oferece o diagnóstico bioquímico de PKU. A investigação molecular, através da detecção de mutações no gene da fenilalanina hidroxilase (PAH) não está prevista, e inexistem dados a este respeito na região nordeste do Brasil. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar uma amostra de pacientes com HPA, quanto aos seus aspectos clínicos, demográficos, epidemiológicos e moleculares, além de avaliar a operacionalização do PNTN nesta região do país. MÉTODOS: Participaram do estudo pacientes da Bahia, Sergipe, Alagoas, Ceará, Maranhão e Piauí. Dados epidemiológicos e demográficos estiveram disponíveis apenas para pacientes da Bahia, e foram obtidos através de consulta a bancos de dados laboratoriais e prontuários médicos, nutricionais e sociais. Informações clínicas dos pacientes dos seis estados foram obtidas através de preenchimento de questionário. A Análise molecular incluiu investigação inicial para sete mutações no gene da PAH, previamente selecionadas (IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R252W, I65T e R408W) entre as mais frequentes em estudos brasileiros anteriores, através de RFLP, seguida de sequenciamento gênico dos éxons 3, 5, 6, 7, 11 e 12 do gene da PAH. Estudos de correlação genótipo-fenótipo foram realizados utilizando informações sobre atividade residual da PAH. RESULTADOS: Entre 1992 e 2009, foram diagnosticados 111 pacientes com HPA na Bahia. A cobertura populacional alcançou 90,81%, e a coleta do exame de triagem neonatal ocorreu após o 7º dia de vida em 76,8% dos casos, sendo a média da incidência de 1:16.362 NV. PKU clássica foi diagnosticada em 56,8% dos pacientes. A mediana de idade na primeira consulta foi de 34,5 dias para a PKU clássica nos últimos dois anos. A avaliação sócio econômica mostrou que 64,1% das genitoras não concluíram o ensino fundamental e 69,5% das famílias tinham renda abaixo de 2 salários mínimos. A partir de amostras de DNA de pacientes de seis estados do nordeste do Brasil, a triagem inicial de sete mutações permitiu a identificação de 64,3% dos genótipos. As mutações mais frequentes foram IVS10nt11g→a (21,3%), V388M e I65T (15,8%) e R252W (14,6%). As menos frequentes foram R261Q (8,7%) e R408W (1,2%). A mutação R261X não foi encontrada. Outras seis mutações foram identificadas através de sequenciamento gênico, com um total de 32 genótipos diferentes. Correlação entre genótipo e fenótipo apresentou-se adequada em 42,7% dos casos. A correlação foi mais evidente entre os pacientes com PKU leve ou moderada (68,2%) e genótipo homocigoto (45,4%). Mutações responsivas ao tratamento com tetrahydrobiopterina (V388M e I65T) foram encontradas com frequência relevante. CONCLUSÕES: Os dados epidemiológicos e clínicos serão de utilidade para a melhor organização das estratégias de saúde pública, enquanto que os dados moleculares poderão ser úteis em sugerir um painel de mutações mais adequado para investigação regional, ao tempo em que pode contribuir na otimização do tratamento e acompanhamento dos pacientes.

Palavras-chave: triagem neonatal, avaliação em saúde, fenilcetonúrias, genótipo, fenótipo, nordeste.

ABSTRACT

Hyperphenylalaninemia (HPA), especially phenylketonuria (PKU) are among the most studied inborn errors of metabolism, once they it is part of neonatal screening programs worldwide. In Brazil, National Neonatal Screening (PNTN) warrants screening, diagnostic confirmation and treatment of this condition across the country through the Reference Services for Neonatal Screening (SRTN). The PNTN offers biochemical diagnosis of PKU. Molecular investigation, by detecting mutations in the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) is not provided, and there are no data so far in the northeast region of Brazil. This study aimed to characterize a sample of patients with HPA, in clinical, demographic, epidemiological and molecular aspects, and assess the implementation of PNTN at this region of the country. **METHODS:** Patients were from Bahia, Sergipe, Alagoas, Ceará, Maranhão and Piauí. Epidemiological and demographic data of patients were available only from Bahia, and were obtained by consulting the laboratory databases and medical, nutritional and social records. Clinical information of patients from all six states were obtained through a questionnaire. Molecular analysis included search for seven mutations in the PAH, previously selected (IVS10nt11g → a, V388M, R261Q, R252W, R408W and I65T) among the most frequent in previous Brazilian studies, using RFLP, followed by gene sequencing for éxons 3, 5, 6, 7, 11 and 12 of PAH gene. Studies of genotype-phenotype correlation were carried out using information on residual activity of PAH. **RESULTS:** Between 1992 and 2009, 111 patients were diagnosed with PAH in Bahia. The population coverage has reached 90.81% and the collection of samples for neonatal screening occurred after the 7th day of life in 76.8% of cases. The average incidence was 1:16.362 newborns. Classical PKU was diagnosed in 56.8% of patients. The median age at first visit was 34,5 days for classical PKU. Socioeconomic evaluation showed that 64.1% of mothers have not completed elementary education and 69.5% of households had income below two minimum wages. Using samples from six states of northeast of Brasil, screening for seven mutations allowed identification of, 64.3% of genotypes. By his screening, the most frequent mutations were IVS10nt11g → a (21.3%), I65T and V388M (15.8%) and R252W (14.6%). R261Q (8.7%) and R408W (1.2%) were less frequent. R261X was not found. Six other mutations have been identified through gene sequencing, with a total of 32 different genotypes. Correlation between genotype and phenotype presented adequate in 42,7% of cases. The correlation was most evident among patients with mild or moderate PKU (68,2%) and homozygous (45.4%). Mutations responsive to treatment with tetrahydrobiopterin (I65T and V388M) were found with significant frequency. **CONCLUSIONS:** The epidemiological and clinical data will be useful for better organization of public health strategies, whereas molecular data may be useful in suggesting a panel of mutations most appropriate for regional research at the time that may contribute to the optimization of treatment and monitoring of patients.

Key-words: neonatal screening, health evaluation, phenylketonuria, genotype, phenotype, northeastern.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

INTRODUÇÃO

Figura 1: Sistema de hidroxilação da fenilalanina em humanos 18

Figura 2: Mapa de Mutações no gene da fenilalanina -hidroxilase 22

ARTIGO 1

Figura 1 – Prevalência de casos de HPA, por municípios baianos, por 100.000 habitantes 50

Figura 2 – Distribuição dos tempos operacionais entre os doentes triados para HPA no SRTN da Bahia entre os anos de 1998 e 2009. 52

LISTA DE TABELAS

	Página
ARTIGO 1	
Tabela 1 - Número de nascidos vivos, testes realizados, cobertura e incidência de PKU entre 1992 e 2009. Serviço de Referência em Triagem Neonatal da Bahia (APAE Salvador).	49
Tabela 2 – Dados operacionais das etapas da Triagem Neonatal para os pacientes triados e confirmados com HPA entre 1998 e 2009. Serviço de Referência em Triagem Neonatal da Bahia (APAE Salvador).	51
ARTIGO 2	
Tabela 1 - Classificação bioquímica das hiperfenilalaninemias	58
Tabela 2 – Idade do início do tratamento, em dias de vida, dos pacientes com diagnóstico de HPA por triagem neonatal no SRTN - Bahia	59
Tabela 3 – Escolaridade dos pais das crianças com diagnóstico de PKU do SRTN – Bahia.	61
ARTIGO 3	
Tabela 1. <i>Primers</i> e endonucleases de restrição utilizados para identificação de mutações de ponto no gene da PAH	71
Tabela 2. Distribuição relativa das mutações IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R252W, I65T e R408W no gene da PAH nos 129 pacientes com PKU de seis estados do nordeste do Brasil	72
Tabela 3. Genótipos de 83 pacientes com PKU no nordeste do Brasil, investigados para as mutações IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R261X, R252W, I65T e R408W no gene da PAH.	73
ARTIGO 4	
Tabela 1. Sistema de predição de fenótipo baseado no genótipo	85
Tabela 2 – Genótipos encontrados em 100 indivíduos com HPA do nordeste do Brasil.	86
Tabela 3 – Fenótipo previsto e fenótipo observado em 89 pacientes com HPA no nordeste do Brasil	87
Tabela 4 – Correlação entre fenótipo previsto e fenótipo observado em 89 pacientes com HPA do nordeste do Brasil	89
Tabela 5 – Percentual de correlação entre fenótipo previsto e observado entre os 28 genótipos analisados	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-PT - 6-piruvoil-tetrahydropterina

6-PTS - 6-piruvoil-tetrahydropterina sintetase

APAE – Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais

BH4 – tetrahydrobiopterina

DHNP - D-eritro-di-hidroneopterina trifosfato

DHPR - di-hidropteridina redutase

DM – deficiência mental

EIM – erro inato do metabolismo

GTP - guanosina trifosfato

GTP-CH - GTP-ciclohidrolase I

HPA – hiperfenilalaninemia

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

NV – nascidos-vivos

O2 – oxigênio

PAH – fenilalanina-hidroxilase

PAL – fenilalanina amônia liase

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Phe – fenilalanina

PKU – fenilcetonúria

PNTN – Programa Nacional de Triagem Neonatal

qBH2 - quinonoide di-hydrobiopterina

qBH4 - L-eritro-tetrahydrobiopterina.

RFLP – Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

RNAm – ácido ribonucleico mensageiro

SNC - sistema nervoso central

SRTN – Serviço de Referência em Triagem Neonatal

Tyr – tirosina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
I. Histórico – descoberta, diagnóstico, tratamento	16
II. Aspectos Bioquímicos e Clínicos da PKU	18
III. Caracterização do Gene da PAH.	20
IV. Triagem Neonatal para PKU	23
JUSTIFICATIVA	25
OBJETIVOS	28
METODOLOGIA	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
ARTIGO 1 - Triagem neonatal para fenilcetonúria na Bahia – Brasil : 17 anos de experiência	33
Resumo	34
Abstract	35
Introdução	36
Métodos	38
Resultados	40
Discussão	42
Conclusão	46
Referências Bibliográficas	46
ARTIGO 2 - Aspectos clínicos e demográficos da fenilcetonúria na Bahia – Brasil	53
Resumo	55
Abstract	55
Introdução	56
Métodos	57
Resultados	58
Discussão	61
Referências Bibliográficas	63

ARTIGO 3 - Estudo das mutações IVS10nt11g-a, V388M, R261Q, R261X, R252W, I65T e R408W no gene da fenilalanina-hidroxilase em pacientes com fenilcetonúria do nordeste do Brasil	66
Resumo	67
Abstract	68
Introdução	69
Pacientes e Métodos	70
Resultados	71
Discussão	73
Conclusão	77
Referências Bibliográficas	78
ARTIGO 4 - Estudo de correlação genótipo-fenótipo em indivíduos com hiperfenilalaninemia do nordeste do Brasil	81
Resumo	82
Abstract	83
Introdução	83
Material e Métodos	84
Resultados	86
Discussão	90
Conclusões	92
Referências Bibliográficas	92
CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
APÊNDICES E ANEXOS	102

I. Histórico – descoberta, diagnóstico, tratamento

A história da Fenilcetonúria (PKU) começou há mais de 70 anos, quando um jovem casal norueguês, Harry e Borgny Egeland, observou que seus dois filhos, crianças aparentemente normais ao nascimento, evoluíam com quadro de deficiência mental (DM) progressiva. Associado a isto, apresentavam um odor “mofado” na urina. Este foi o início de uma incessante busca pelo diagnóstico, através da persistência de uma mãe, Borgny Egeland, que não desistiu até descobrir o que ocorria com suas duas “belas mas retardadas crianças”, Liv e Dag (CENTERWALL & CENTERWALL, 2001).

A Fenilcetonúria (PKU) clássica foi reconhecida pela primeira vez como uma doença metabólica distinta causando DM grave e irreversível, em 1934, pelo médico e químico norueguês Asbjörn Fölling. Após ser contatado pela família Egeland (havia sido professor de química de Harry Egeland na Faculdade de Odontologia), o Dr. Fölling iniciou uma série de testes na urina das crianças. Ao adicionar cloreto férrico, um sal de ferro que leva a colocação marrom-avermelhada na presença de cetonas, observou um resultado inusitado – o aparecimento de uma cor verde escura, uma reação ainda não descrita. Ensaios subsequentes culminaram com a detecção da excreção de ácido fenilpirúvico e fenilacetato (este responsável pelo estranho odor observado pelos pais). Numa clara demonstração de rigor científico, e sem perder de vista as manifestações clínicas apresentadas pelas crianças, Asbjörn Fölling contatou instituições próximas a Oslo que atendiam crianças com DM, e investigou o distúrbio metabólico em 430 indivíduos, tendo encontrado oito casos positivos. Seis meses depois de ter conhecido a família Egeland, publicou seus achados, denominando a doença recém descoberta, “Imbecillitas Phenylpyruvica” (FÖLLING, 1943).

Lionel Penrose, em 1935, através de estudos de genealogia das famílias afetadas, confirmou essa doença metabólica como sendo herdada como uma característica autossômica recessiva, e o termo fenilcetonúria (fazendo referência à excreção anormal de uma fenilcetona – o ácido fenilpirúvico – na urina dos afetados) foi subsequentemente introduzido para descrever essa anormalidade (PENROSE & QUASTEL, 1937).

A deficiência bioquímica responsável pela PKU somente foi identificada em 1947, por George Jervis, mostrando que a administração de fenilalanina causava rápida elevação nos níveis séricos de tirosina em indivíduos normais, mas em

indivíduos com PKU isso não era observado. Subsequentemente, outros estudos (JERVIS, 1953) forneceram a primeira evidência direta que a PKU era causada por uma deficiência grave no sistema enzimático hepático que converte fenilalanina em tirosina, através de um processo de hidroxilação.

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. Os pacientes desenvolvem DM grave, microcefalia, epilepsia, irritabilidade, hipertonia, peculiaridades na marcha, eczema e tendem a ser menos pigmentados. Por muitos anos desde a sua descoberta, a PKU foi considerada uma doença que levava à DM, sem que nada pudesse ser feito. Entretanto, na década de 1950, estudos foram iniciados no intuito de desenvolver um tratamento, consistindo na restrição dietética de fenilalanina (Phe) (BICKEL *et al.*, 1953).

Os primeiros casos tratados com sucesso consistiram em irmãos mais jovens de crianças com DM diagnosticadas com PKU. Estas crianças tinham então sua urina testada e, caso fosse identificada a presença do ácido fenilpirúvico, iniciavam dieta restrita em Phe, antes do estabelecimento da DM (HORNER, 1956).

No entanto, um desafio se impunha: como diagnosticar (e tratar) bebês que não tivessem um irmão mais velho com os sintomas da doença? Em outros termos: como erradicar a DM causada pela PKU não tratada?

No final da década de 1950 foram iniciados estudos de triagem de bebês, através e testagem da urina em fraldas. Este “teste da fralda”, que consistia na adição de cloreto férrico à fralda recentemente molhada, todavia só poderia ser realizado com resultados confiáveis após algumas semanas de vida, uma vez que a excreção do ácido fenilpirúvico demora a ocorrer. Este atraso, além de levar a redução da cobertura do teste, retardava também o início do tratamento (CENTERWALL, 1957).

No início da década de 1960, o teste de inibição bacteriana de Guthrie (GUTHRIE & SUSI, 1963), realizado em amostras de sangue e, portanto, apresentando sensibilidade nos primeiros dias de vida, foi desenvolvido e permitiu a triagem da PKU em larga escala. Por apresentar a limitação de não poder ser realizado em recém—nascidos em uso de antibioticoterapia, o teste de Guthrie, semi-quantitativo, foi progressivamente sendo substituído por métodos quantitativos, que inclusive permitiram melhor controle do tratamento, como o método fluorimétrico

(McCAMAN & ROBINS, 1962) e, mais recentemente, a espectrometria de massas em *tandem* (MILLINGTON *et al.*, 1991).

Atualmente, quase todos os países do mundo realizam triagem neonatal para PKU. Sua frequência varia amplamente entre as populações – de 1:2.500 na Turquia, 1:4.500 na Irlanda, 1:16.000 na Suíça (DiLELLA *et al.*, 1986), a 1:50.000 nos afrodescendentes dos EUA (HOFMAN *et al.*, 1991). Sua incidência é estimada em 1:10.000 em caucasoides (BICKEL *et al.*, 1981).

Setenta e seis anos depois da descoberta da PKU, Borgny Egeland, cujos filhos faleceram antes de poderem se beneficiar do tratamento, e que em 1984 foi homenageada pela Academia Norueguesa de Pediatria, pode ser lembrada como um exemplo de que a tenacidade faz a diferença, e molda o futuro.

II. Aspectos Bioquímicos e Clínicos da PKU

A hidroxilação da Phe em humanos é uma reação complexa envolvendo pelo menos seis enzimas diferentes e seus cofatores, podendo ser observada esquematicamente na Figura 1. A reação central, a oxidação da L-fenilalanina (aminoácido essencial, não sintetizado pelo organismo) para L-tirosina (aminoácido não essencial), é catalisada pela fenilalanina hidroxilase – PAH (fenilalanina 4-mono-oxigenase; PAH; EC 1.14.16.1). Esta é a via principal de catabolização da Phe ingerida, responsável por cerca de 75% da eliminação desse aminoácido (SCRIVER *et al.*, 2001).

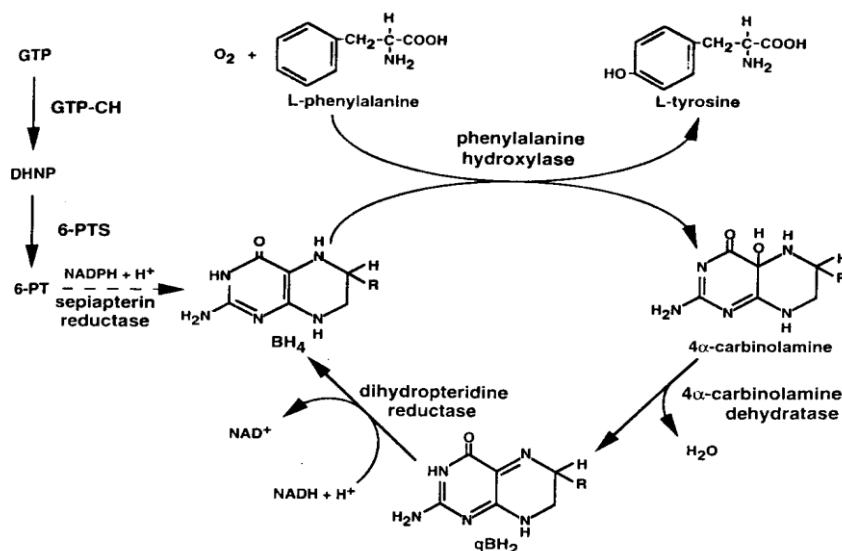


Figura 1: Sistema de hidroxilação da fenilalanina em humanos, incluindo as vias sintéticas e regenerativas do cofator pterina. GTP, guanosina trifosfato; GTP-CH, GTP-ciclohidrolase I; DHNP, D-eritro-di-idroneopterin trifosfato; 6-PTS, 6-piruvil-tetraidropterina sintetase; 6-PT, 6-piruvil-tetraidropterina; qBH₂, quinonoide di-idrobiopterina; qBH₄, L-eritro-tetraidrobiopterina.

A presença da PAH, oxigênio (O_2), L-fenilalanina (Phe) e do cofator tetraidrobiopterina (BH4) são requisitos básicos para que ocorra a reação de hidroxilação. Para a regeneração do cofator BH4, são necessários di-idropteridina redutase (DHPR), nucleotídeo piridina reduzido e 4 α -carbinolamina desidratase. Na síntese de BH4 participam a GTP-CH (guanossina trifosfato cicloidrolase) e 6-PTPS (6- pirovoil-tetraidropterina sintetase).

As hiperfenilalaninemias (HPA) são distúrbios da hidroxilação da Phe, sendo 99% decorrentes de defeitos na PAH e 1% relacionados à deficiência na biossíntese (deficiência de GTP-CH ou 6-PTS) ou na regeneração do cofator BH4 (atividade deficiente de DHPR ou 4 α -carbinolamina desidratase). Estes últimos exigem diagnóstico diferencial com avaliação cuidadosa do metabolismo da biopterina após detecção de uma elevação dos níveis séricos de Phe (BURGARD, 2009).

Entende-se por PKU a HPA grave o suficiente para requerer intervenção terapêutica. A PKU clássica (MIM# 261600) é o mais comum dos erros inatos do metabolismo (EIM) dos aminoácidos, com herança autossômica recessiva, resultante na grande maioria dos casos de mutação no gene da PAH (MIM# 251580). A alteração nesse gene leva à deficiência de seu produto, promovendo, com isso, o aumento dos níveis séricos de Phe e de seus metabólitos secundários (SCRIVER & KAUFMAN, 2001). Bioquimicamente, a HPA é definida como um valor plasmático de Phe acima de 120 μ M (2mg/dL), e prejudica os processos celulares cerebrais essenciais, principalmente mielinização e síntese de proteínas. Somando-se a isto, estão envolvidas ainda na fisiopatologia da doença as consequências da deficiência de produção de neurotransmissores.

A PKU foi o primeiro EIM descrito com comprometimento do sistema nervoso central (SNC) e a primeira forma de deficiência mental (DM) relacionada com um defeito enzimático específico.

A DM pode ser prevenida pelo uso de uma dieta pobre em fenilalanina, a partir de proteínas hidrolisadas modificadas ou aminoácidos livres suplementados com vitaminas adicionais e nutrientes. Instituída a partir de poucas semanas de vida, deve ser mantida por toda a vida, já que há evidências do benefício de sua manutenção mesmo após o término do desenvolvimento do SNC, uma vez que com a interrupção da dieta foi observado declínio nas funções neuropsicológicas (MIRA, 2000). Apesar de comprovadamente eficaz, a dieta pobre em Phe é também

extremamente restritiva e monótona, o que compromete a adesão ao tratamento (SULLIVAN, 2001). Além disso, deficiências nutricionais podem ocorrer (BARRETTO et al, 2008).

A terapia de reposição enzimática usando enzima sintética com atividade semelhante à da PAH, a Fenilalanina-amônia-liase (PAL), encontra-se em fase de estudos pré-clínicos, com resultados promissores (BLAU, 2010).

A terapia gênica somática utilizando gene recombinante funcional ainda se encontra em fase experimental, existindo modelo animal para teste de diferentes vetores e estratégias para transferência gênica (SANTOS et al., 2006).

Existe ainda a possibilidade do uso de suplementação com tetrahydrobiopterina (BH4), mesmo em pacientes que não apresentam deficiência deste cofator (desde que disponham de alguma atividade residual da PAH). Várias hipóteses suportam estes achados, entre elas o conhecimento de que algumas mutações no gene da PAH podem aumentar a afinidade da enzima pelo cofator, o BH4 pode estabilizar a PAH contra clivagem proteolítica, estabilizar o RNAm ou regular a expressão do gene da PAH (BLAU & ERLANDSEN, 2004). Esta modalidade terapêutica parece sofrer influência direta do genótipo apresentado pelo paciente (TREFZ *et al*, 2008).

Uma outra forma de HPA relaciona-se com a ocorrência de uma síndrome conhecida com PKU materna (GÜTTLER *et al.*, 2003), caracterizada por DM, microcefalia, déficit de crescimento e malformações, particularmente cardíaca, em filhos (não afetados por PKU) de mães afetadas por PKU que não realizam uma terapia adequada durante a gravidez, devido ao efeito teratogênico dos níveis de Phe elevados, que ultrapassam a barreira transplacentária. O controle rigoroso dos níveis de Phe durante a gravidez permite desenvolvimento normal do feto.

III. Caracterização do Gene da fenilalanina-hidroxilase (PAH)

A PAH humana é codificada por um gene de cópia única, que foi clonado em 1983 e está mapeado no cromossomo 12, região 12q22-q24.1 (WOO, 1983) sendo altamente polimórfico. O gene possui uma extensão de 125 kb, contendo 13 éxons, os quais ocupam uma sequência de DNA de 90 kb. O RNA mensageiro maduro possui um tamanho de aproximadamente 2,4 kb. A maioria dos éxons ocorre na metade 3' do gene. Os éxons 6-13 estão agrupados num fragmento de 20 kb do

gene, enquanto que os éxons 1-5 são separados por introns grandes, cujo tamanho varia de 3 a 23 kb (DiLELLA *et al.*, 1986).

A PKU é um distúrbio geneticamente heterogêneo, havendo mais de 550 mutações identificadas no gene da PAH, embora apenas um número limitado dessas mutações esteja presente em determinada população, incluindo mutações tipo *missense*, deleções, *splicing*, silenciosas, *nonsense* e inserção (Nowacki *et al.*, 1998; Scriver *et al.*, 2000; Phenylalanine Hydroxylase *Knowledgebase*, 2010).

A estatística de mutações contida no banco de dados da PAH mostra que a maioria das mutações descritas está localizada no éxon 7 do gene da PAH (Figura 2), porém a mutação R408W, localizada no éxon 12, é a mais frequentemente identificada das mutações em diversos estudos realizados em diferentes populações, seguida da IVS10nt-11g→a, I65T e R261Q, sendo as demais mutações menos frequentes. Os países com o maior número de mutações descritas são a Inglaterra, Espanha, Canadá, EUA, Itália, Noruega, Bélgica e Alemanha (Scriver *et al.*, 2001).

A elevada frequência relativa de mutações associadas à PKU no éxon 7 do gene da PAH não significa que esta região do gene seja hipermutável. Os cálculos de frequência de mutação relacionados ao tamanho do éxon e à sua composição não dão apoio à hipótese de que esse éxon seja um *hot spot* para mutações associadas à PKU (EISENSMITH & WOO, 1992). Na realidade, esse éxon confere uma função essencial para a hidroxilação da Phe, e qualquer mudança no domínio codificado por este éxon altera a função e manifesta-se clinicamente como HPA.

IV. Triagem Neonatal para PKU

A possibilidade de tratamento para PKU, evitando a manifestação da doença, desde que instituído precocemente, levou ao estabelecimento de programas de triagem neonatal em muitos países, sendo os primeiros iniciados na Califórnia, no ano de 1957, e em seguida por britânicos baseados no teste do cloreto férrico que detecta fenilpiruvato urinário. O teste semiquantitativo para medir fenilalanina sérica desenvolvido por Guthrie & Susi (1963) aperfeiçoou o método, sendo a HPA detectada através de sangue do calcanhar (GUTHRIE, 1996). A triagem neonatal é o melhor método de detecção precoce de PKU. O termo “Teste do Pezinho” foi cunhado no Brasil.

O programa de triagem neonatal para PKU no Brasil teve início na cidade de São Paulo a partir de junho de 1976, numa instituição assistencial para deficientes mentais (APAE São Paulo – Associação de Pais e Amigos de Excepcionais). Desde então outros programas têm sido implementados em outros estados do Brasil, e a partir da portaria de número 822 de 06 de junho de 2001, foi estruturado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), e credenciados Serviços de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), havendo 30 serviços em 23 Estados (BRASIL, 2007; CARVALHO *et al.*, 2007).

Dados prévios do SRTN da Bahia (APAE-Salvador) mostram incidência de 1:22.000 neste estado (AMORIM *et al.*, 2005). Desde 2001 a Bahia encontra-se na Fase II do PNTN, encarregando-se da triagem para PKU, hipotireoidismo congênito, anemia falciforme e outras hemoglobinopatias. Os 417 municípios do estado da Bahia estão conveniados com a APAE Salvador e têm como responsabilidade, dentro do programa, realizar a coleta, enviar as amostras ao laboratório da APAE Salvador, localizar os casos diagnosticados após convocação pelo serviço de busca ativa do SRTN e viabilizar o comparecimento da criança para as consultas no SRTN

(APAE Salvador, 2010). Em estudos realizados no Brasil foi demonstrada cobertura populacional de testes do pezinho de 81% para Santa Catarina, 62%, 15% e 32,2%, para o Distrito Federal, Sergipe e Campina Grande, respectivamente (CARVALHO, 2003; RAMOS *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2003, RAMALHO *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006; MONTEIRO E CÂNDIDO, 2006;). Considerando dados previamente publicados de alguns estados do Brasil, constatamos que a Bahia é o estado do Nordeste com a maior cobertura (90,87 em 2009) (Amorim, 2010, comunicação pessoal). Segundo dados do Ministério da Saúde, Em 2007 a menor cobertura do Brasil foi do Amapá, com 52,41%, seguida de perto por Pernambuco (52,56%), e a maior foi do Paraná, com 103,63%, possivelmente refletindo a realização de testes em recém-nascidos oriundos de estados vizinhos (BRASIL, 2007) Informações sobre o funcionamento dos programas de triagem neonatal são também escassas, especialmente no nordeste do Brasil (RAMOS *et al.*, 2003; RAMALHO *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006), e seu conhecimento reveste-se de especial importância para auxiliar no estabelecimento e manutenção de estratégias de saúde pública realmente efetivas na prevenção da DM causada pela PKU não tratada.

Esses programas realizam o diagnóstico bioquímico convencional de PKU, não havendo em nossa região estudo de caracterização molecular para deficiências da PAH utilizando uma abordagem ampla de investigação. No Brasil, os estudos abordando o diagnóstico molecular de PKU limitam-se, até o momento, ao sul e sudeste do país (ACOSTA *et al.*, 2001; SANTANA-DA-SILVA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2010).

Em virtude da grande heterogeneidade alélica existente no gene da PAH responsável pela PKU, das características étnicas e geográficas bastante heterogêneas em nosso país, e o fato de possuímos dados sobre a composição molecular dessa doença apenas em estudos realizados nas regiões Sul e Sudeste, faz-se necessário o desenvolvimento de um estudo mais amplo para o conhecimento das bases moleculares dessa doença em nosso país. Com a realização deste estudo, avaliando indivíduos da região nordeste do Brasil, a estratégia de investigação das bases moleculares da PKU poderá ser aperfeiçoada, pois conheceremos o padrão de distribuição das mutações responsáveis por essa doença de maneira regionalizada.

Atualmente os SRTN existentes em nosso país oferecem diagnóstico convencional de PKU, necessitando constantemente de exclusão de outras causas possíveis de HPA, como a HPA transitória, na qual não há defeito genético subjacente, e a alteração bioquímica desaparece espontaneamente nos primeiros meses de vida, e HPA não PKU, onde níveis levemente elevados de fenilalanina são permanente e, embora não demandem tratamento, devem ser acompanhados (CEDERBAUM, 2002). Além disso, a determinação da gravidade da doença é realizada por testes de Phe não podem ser aplicados antes de a criança completar seis meses de idade, e estudos de tolerância dietética devem ser levados a cabo com grande prudência, devido aos riscos de lesão neurológica. 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).

Além disso, a reposição do BH4 é uma modalidade alternativa de tratamento, com eficácia bem estabelecida na literatura (ZURFLÜH *et al.*, 2008) para aqueles pacientes que, embora não tenham alteração no metabolismo deste cofator, respondem à sua administração com queda significativa dos níveis de Phe. A detecção das mutações causadoras da PKU pode ser útil para indicar a terapia com BH4 (TEFZ *et al.*, 2008). Com isso, o tratamento pode ser otimizado.

Adicionalmente, a investigação das bases moleculares da PKU no nordeste do Brasil possibilitará também a oferta de aconselhamento genético seguro e eficaz, de maneira regionalizada, com redução dos custos, de acordo com a realidade de cada local, inclusive para casais portadores ainda sem prole afetada, porém com risco para tal.

A caracterização clínica, demográfica e epidemiológica dos casos estudados poderá ser útil para fornecer informações relevantes aos gestores de saúde pública.

I. GERAIS

1. Definir as bases moleculares responsáveis pela HPA em indivíduos procedentes dos estados da região nordeste do Brasil;
2. Descrever as características epidemiológicas do PNTN para HPA no estado da Bahia;
3. Descrever as características clínicas e demográficas dos pacientes com diagnóstico de PKU ou HPA não-PKU acompanhados no SRTN da Bahia.

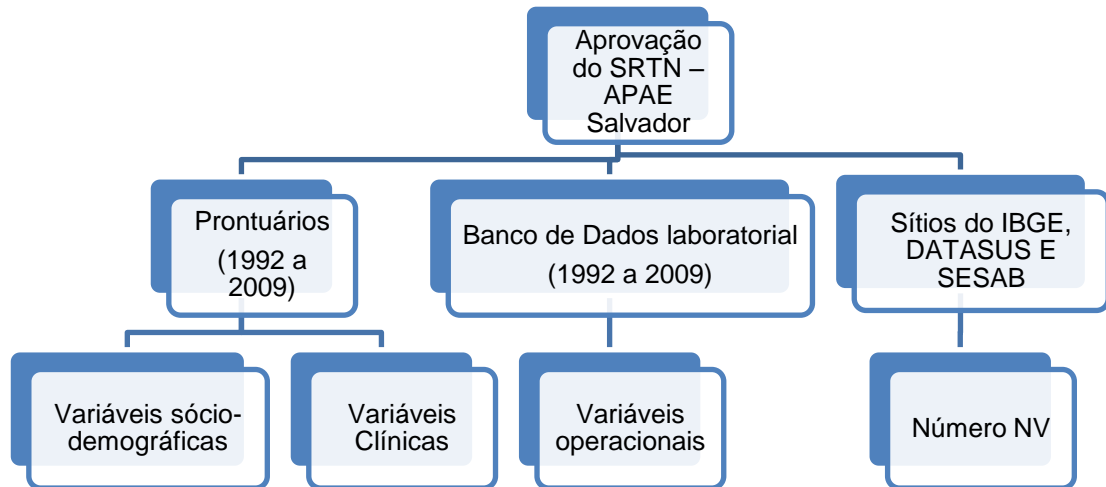
II. ESPECÍFICOS

1. Detectar mutações no gene da PAH em indivíduos com diagnóstico de HPA;
2. Descrever a distribuição das mutações do gene da PAH na região nordeste brasileira;
3. Propor painel de mutações mais comuns em cada estado do nordeste do Brasil, para avaliação individualizada;
4. Estabelecer estudos de correlação genótipo-fenótipo.

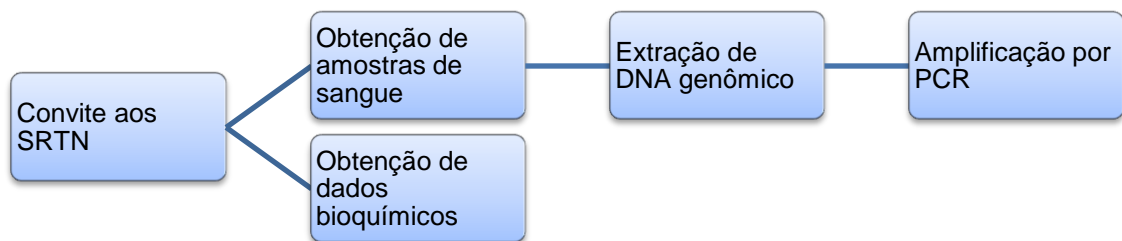
METODOLOGIA

(Os métodos encontram-se detalhados nos artigos que compõem o capítulo
RESULTADOS E DISCUSSÃO)

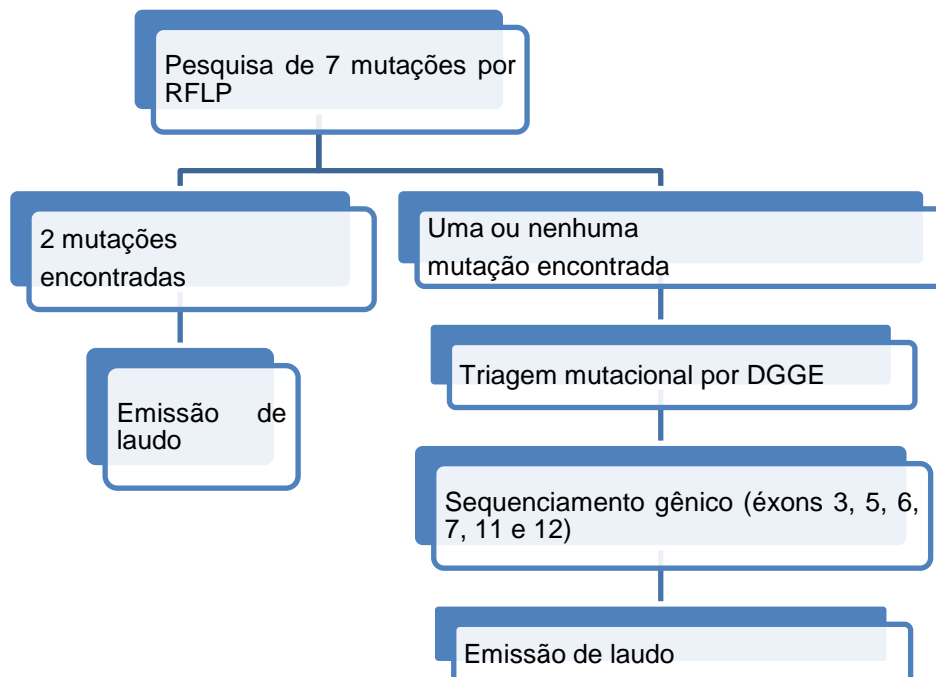
Estratégia para obtenção de dados clínicos, demográficos e epidemiológicos da Bahia



Estratégia para obtenção de amostras e dados bioquímicos e análise molecular



Estratégia de Análise Molecular



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão encontram-se descritos nos artigos 1, 2, 3 e 4, apresentados a seguir.

**ARTIGO 1 – TRIAGEM NEONATAL PARA FENILCETONÚRIA NA BAHIA –
BRASIL : 17 ANOS DE EXPERIÊNCIA**

Neonatal screening for phenylketonuria in Bahia - Brazil : 17 years of experience

Amorim T, Alves KRR, Boa-Sorte N, Leite MEQ, Pimentel H, Acosta AX.

- Este artigo corresponde ao proposto no Objetivo Geral nº 2 - Descrever as características epidemiológicas do PNTN para HPA no estado da Bahia.
- Situação do artigo: submetido à publicação na Revista de Saúde Pública.

TRIAGEM NEONATAL PARA FENILCETONÚRIA NA BAHIA – BRASIL : 17 ANOS DE EXPERIÊNCIA

Neonatal screening for phenylketonuria in Bahia - Brazil : 17 years of experience

Amorim T¹, Boa-Sorte N², Alves KRR², Leite MEQ¹, Pimentel H¹, Acosta AX³.

¹Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Salvador

Endereço: Alameda Verona, 32, Pituba, Salvador—Bahia²Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Rua Henrique Dias, SN, Nazaré, Salvador-Bahia

³Faculdade de Medicina da Bahia – Universidade Federal da Bahia

Endereço: Rua Augusto Vianna, SN, HUPES =- 6* andar, Salvador-Bahia

Correspondência para (Corresponding Author): Tatiana Amorim

Endereço: Alameda Verona, 32, Pituba, CEP 41430-465

Telefone: 55 71 3270 8302

e-mail: amorim.tatiana@uol.com.br

Subvenção: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia, Bolsa de Doutorado, processo número (BOL n0 1737/2006 e BOL n0 1684/2009)

RESUMO

Fenilcetonúria (PKU) é um dos mais comuns erros inatos do metabolismo, podendo levar ao retardo mental, se não tratada. No Brasil, o Programa Nacional de Triagem Neonatal estabeleceu o rastreio para PKU em todos os estados da federação, através do credenciamento de Serviços de Referência em Triagem Neonatal (SRTN), responsáveis pela triagem de todos os nascidos-vivos (NV) do estado, confirmação diagnóstica dos casos suspeitos, busca ativa, tratamento e acompanhamento dos casos positivos. Para avaliar a triagem neonatal para PKU no SRTN da Bahia, dados operacionais do programa e sócio-demográficos dos pacientes foram compilados, através de consulta a arquivos e prontuários. Entre 1992 e 2009, foram diagnosticados 111 pacientes com fenilalanina persistentemente elevada, dentre 1.939.329 crianças rastreadas. A cobertura populacional progrediu de 2,2% para 90,81% dos nascidos-vivos, tendo atingido a adesão de 100% dos municípios baianos em 2007. A média da incidência, nos últimos três anos (2007 a 2009), foi de 1:16.362 NV. A coleta ocorreu fora do período recomendado (3º ao 7º dia de vida) em 76,8% dos casos, com média de 16,4 dias em 2008/2009, representando metade do tempo gasto entre o nascimento e a chegada da amostra

de sangue seco ao laboratório. A idade na primeira consulta apresentou redução média de três dias/ano no período, chegando a 39,6 dias (PKU clássica) em média. Conclui-se que a triagem neonatal para PKU evoluiu de forma significativa; contudo, alguns aspectos (idade da coleta e o tempo de envio da amostra) precisam ser aprimorados, para atingir a meta de tratamento na idade ideal.

Palavras-chave: triagem neonatal, avaliação em saúde, fenilcetonúrias, erros inatos do metabolismo

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) is one of the most common inborn errors of metabolism and can lead to mental retardation if untreated. In Brazil, National Neonatal Screening Program (PNTN) for PKU established its screening in all states of the country, through the accreditation of Reference Services in Neonatal Screening (SRTN), responsible for screening of all live births (LB) of the state, diagnosis confirmation of suspect cases, active search, treatment and follow-up of positive cases. To evaluate neonatal screening for PKU in SRTN Bahia, operational data of the program and socio-demographic characteristics of patients were compiled by consulting the files and medical records. Between 1992 and 2009, 111 patients were diagnosed with phenylalanine persistently high among 1,939,329 children screened. The population coverage progressed from 2.2% to 90.81% of live births, reaching 100% membership of the municipalities in 2007. The average incidence in the last three years (2007-2009) was 1:16.362NV. Blood samples collection took place outside the recommended period (3 to 7 days of life) in 76.8% of cases, with an average of 16.4 days in 2008/2009, representing half the time spent between birth and the arrival of dried blood sample at laboratory. The median age at first visit decreased an average of 3 days per year in the period, reaching 39.6 days (classical PKU). We conclude that neonatal screening for PKU has evolved significantly, however, some aspects (age collection and delivery time of the sample) must be improved to achieve the goal of treatment in the ideal age.

Keywords: neonatal screening, health evaluation, phenylketonuria, inborn errors of metabolism

INTRODUÇÃO

Apesar de iniciativas surgidas desde a década de 70, a triagem neonatal no Brasil adquiriu condição de programa de saúde pública a partir de 2001, quando foi lançado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), através da portaria n^o 822/2001 do Ministério da Saúde que credenciou os Serviços de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) em todos os estados brasileiros. Esse programa tem como metas a cobertura universal e garantia de realização de todas as etapas, que vão desde a coleta até o tratamento e acompanhamento dos casos detectados. O PNTN está organizado em três fases de implantação: Fase I – Hipotireoidismo Congênito (HC) e PKU; Fase II - HC, PKU e hemoglobinopatias; Fase III - HC, PKU, hemoglobinopatias e fibrose cística. *,⁹

Na Bahia, a realização da triagem neonatal iniciou-se no ano de 1992, na Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Salvador,^{2, †} mas obteve maior amplitude com a implantação do PNTN, que credenciou a instituição como SRTN no estado.[‡] Desde 2007, os 417 municípios da Bahia estão conveniados com o SRTN, e tem como responsabilidade, dentro do programa, realizar a coleta e enviar as amostras ao laboratório de referência, localizar os casos diagnosticados após convocação pelo serviço de busca ativa e viabilizar o comparecimento da criança para as consultas no SRTN. § Neste momento, a Bahia encontra-se na Fase II do PNTN, encarregando-se da triagem e tratamento para Fenilcetonúria, Hipotireoidismo Congênito e Hemoglobinopatias.

Apesar de ser a patologia triada no PNTN com a menor incidência descrita, a fenilcetonúria (PKU) é um dos erros inatos do metabolismo mais comuns em todo o mundo, com uma frequência que varia de 1:8.000 a 1:25.000 NV em populações

* Ministério da Saúde. Portaria GM/MS n.º 822/GM. <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2001/GM/GM-822.htm> (accessed on 02/May/2009).

† Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador. Manual de Práticas do Programa de Triagem Neonatal na Bahia. Salvador: Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador; 2010.

‡ Ministério da Saúde. Média e Alta Complexidade – Triagem Neonatal. http://portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/visualizar_texto.cfm?idtxt=23149 (accessed on 02/Jan/2011).

§ Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador. Manual de Práticas do Programa de Triagem Neonatal na Bahia. Salvador: Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador; 2010.

européias e asiáticas,¹⁰ sendo de aproximadamente 1:11.000NV em Portugal.¹⁹ No Brasil, a frequência descrita varia entre, aproximadamente, 1:15.000 a 25.000I NV,⁸ tendo sido anteriormente descrita como de 1:22.000 NV na Bahia².

A presença de mutações em ambos os alelos do gene que codifica a enzima fenilalanina-hidroxilase (PAH) leva a deficiência na síntese ou função desta enzima hepática, responsável pela transformação do aminoácido fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). Consequentemente, ocorre um aumento nas concentrações séricas de Phe, e de seus subprodutos (fenilpiruvato, fenilacetato, fenilactato e fenilacetilglutamina) na urina,⁵ o que leva, juntamente com a deficiência na produção de neurotransmissores e outros fatores ainda não bem estabelecidos, a alterações no sistema nervoso central (SNC), com aparecimento de comportamento autístico, transtornos de conduta e deficiência mental (DM) grave e irreversível, com comprometimento significativo da qualidade de vida, quando o tratamento dietético não é instituído precocemente^{4,13,14}.

As hiperfenilalaninemias (HPA) podem ser classificadas em PKU clássica, PKU leve e HPA não-PKU. Na PKU clássica a concentração de fenilalanina 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.⁷

Devido à dificuldade de diagnóstico clínico da doença nos primeiros meses de vida, o rastreamento neonatal através de exames laboratoriais, conhecido no Brasil como “Teste do Pezinho”, torna-se uma ferramenta fundamental para a detecção e intervenção precoces.¹² Contudo, alguns marcos operacionais devem ser alcançados como a realização da coleta do sangue seco 48 horas após a primeira mamada do recém-nascido e até o sétimo dia de vida, e o início do tratamento até o final do primeiro mês de vida⁹, submetendo-se à criança uma dieta restrita em Phe¹³.

Visando um maior conhecimento sobre a PKU e sobre o programa de prevenção dos seus graves danos neurológicos, e em virtude da evidência de poucos

artigos sobre o tema, este trabalho tem por objetivo avaliar o Programa de Triagem Neonatal para fenilcetonúria, no Estado da Bahia, através da análise de seus aspectos operacionais desempenhados pelo SRTN/APAE Salvador.

MÉTODOS

Foi conduzido um estudo retrospectivo utilizando dados extraídos dos resultados de exames e das consultas realizadas no SRTN da Bahia, no período de 1992 a 2009. Inicialmente, foi realizado um levantamento dos dados operacionais da triagem neonatal na Bahia e, em seguida, dos dados referentes aos pacientes triados e acompanhados com diagnóstico confirmado de HPA e acompanhados na APAE-Salvador. Não foram incluídos dados de exames realizados em laboratórios privados, uma vez que estes não são cadastrados pelo Ministério da Saúde como Serviços de Referência no estado.

As etapas do funcionamento do SRTN se iniciam após a coleta de sangue seco em papel filtro nos postos de saúde ou afins e o envio das amostras ao laboratório de referência, onde são cadastradas, têm a qualidade avaliada e são processadas e analisadas por imunofluorescência com equipamento automatizado modelo CODA, (BIORAD[®]), utilizando-se kit comercial da mesma empresa. Após o resultado, os exames alterados são informados à equipe de busca ativa, cujas ações incluem contato com os municípios para informação de suspeita e solicitação de coleta ou envio das crianças ao SRTN, acompanhando o processo até a chegada do paciente para consulta.

Os procedimentos de re-convocação dos casos suspeitos variam de acordo com o fenótipo bioquímico observado. Em suspeitos de PKU clássica ou leve, o paciente é convocado para consulta especializada imediatamente após o resultado positivo. Nos casos de HPA não PKU, por ser frequente o achado de HPA transitória, sem deficiência enzimática, solicita-se nova amostra para confirmação. Nestes casos, mantendo-se valores de Phe acima do normal, mesmo sem indicação de tratamento, a criança é convocada para consulta médica, nutricional, social, psicológica e de aconselhamento genético, e tem acompanhamento clínico-laboratorial periódico. Apesar da maioria dos casos permanecerem bioquimicamente estáveis e sem necessidade de tratamento, alguns pacientes com diagnóstico inicial de HPA não PKU elevam os níveis de fenilalanina posteriormente e passam a necessitar de

tratamento específico. Em todos os casos, realiza-se rigoroso acompanhamento do desenvolvimento neuropsicomotor da criança. Casos em que a evolução neurológica é desfavorável, a despeito de tratamento precoce e adequado, são investigados para deficiência de cofator (BH4).^{**}

As variáveis operacionais estudadas foram:

- a) Quantidade dos postos de coleta do estado/ano;
- b) Cobertura do teste do pezinho no estado (definido pela razão entre o número de triados e o número de NV, multiplicado por 100);
- c) Número de crianças testadas pelo serviço/ano;
- d) Incidência da doença no período de 1992 a 2009 (calculada pela razão entre o número de casos de HPA confirmados e o número de NV e expressa por caso/NV);
- e) Idade dos pacientes com HPA na realização da primeira coleta para o exame (foi considerado como idade ideal para a coleta do exame de triagem neonatal o período entre o 3º e o 7º dia de vida;
- f) Tempo decorrido entre a coleta e a chegada da amostra no laboratório de triagem neonatal, denominado tempo de retenção da amostra;
- g) Tempo decorrido entre a chegada da amostra e a liberação do resultado - tempo de processamento/resultado;
- h) Tempo decorrido entre a liberação do resultado e a primeira consulta do paciente - tempo de busca ativa
- i) Idade dos pacientes na primeira consulta.

Também foram descritos o número de pacientes que obtêm diagnóstico tardio (definido como diagnóstico por suspeita clínica e não por triagem neonatal); presença de outros casos na família; sexo e município de origem dos pacientes.

O número de NV no período do estudo foi obtido nos sítios do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) ^{††} para os anos de 1992 e 1993, do

^{**} Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador. Manual de Práticas do Programa de Triagem Neonatal na Bahia. Salvador: Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador; 2010

^{††} www.ibge.gov.br/.../estatistica/populacao/evolucao_perspectivas_mortalidade/evolucao_mortalidade.pdf - 2004-10-13 - Text Version

DATASUS (1994 a 2007)^{††} e da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (2008 e 2009)^{§§}. Para o cálculo da prevalência cumulativa utilizou-se a razão entre todos os casos de HPA diagnosticados e acompanhados no SRTN até o final de 2009 (soma dos casos de HPA triados pelo teste do pezinho, com os diagnosticados tardiamente) e o número de habitantes do estado em 2009, conforme descrito pelo IBGE.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva, com cálculo de medidas de frequência, tendência central e dispersão. A normalidade das variáveis contínuas foi verificada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. A análise de variância (ANOVA) ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foram utilizados para comparar características operacionais entre os diferentes fenótipos bioquímicos da HPA. A regressão linear múltipla foi utilizada para verificar o efeito do tempo (ano de coleta), tipo de fenótipo bioquímico (1=HPA não PKU; 2=PKU Leve; 3=PKU Clássica) e a existência de outro caso na família (0=Não; 1=Sim) na idade da coleta, tempo de retenção de amostra, tempo de processamento-resultado, tempo de busca ativa e idade na primeira consulta. A entrada e a análise de dados foram realizadas utilizando-se o programa Microsoft Office Excel para Windows® versão 2003 e o SPSS para Windows®, versão 11.0.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências (FBDC), sob protocolo nº 56/2007. Utilizou-se o Termo de Permissão de Uso e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a execução da coleta no banco de dados da APAE Salvador.

RESULTADOS

O número total de recém-nascidos triados, no período de 1992 a 2009, foi de 1.939.329, com aumento crescente anual, atingindo o máximo em 2009. Neste mesmo ano, estavam cadastrados 2.264 postos de coleta, indicando um aumento superior a 200% no número de locais de coleta (Tabela 1).

A cobertura populacional atingiu 90,81% dos nascidos vivos registrados em 2009, com incidência média de 1:16.362 NV, nos últimos três anos (Tabela 1). A

^{††} <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinasc/cnv/nvba.def>

^{§§} <http://www.saude.ba.gov.br/cgi/deftohtm.exe?tabnet/sinasc/nvba.def>

prevalência encontrada foi de 1:126.319 habitantes (0,79 casos/100.000 hab), com proporção masculino/feminino de 1:1,09, sendo 58 (52,3%) do sexo feminino. A Figura 1 descreve a prevalência atual (por 100.000 habitantes) das HPA por município, com destaque para os municípios de Tanhaçu, Monte Santo, e Teofilândia.

A classificação do fenótipo bioquímico observado revelou que 63 pacientes (56,8%) obtiveram o diagnóstico de PKU clássica, 25 (22,5%) de PKU leve, 22 (19,8%) de HPA não-PKU e uma criança (0,9%) apresentou deficiência de BH₄. Dentre os pacientes acompanhados no SRTN, 20 (18,0%) tiveram diagnóstico tardio, 87 (78,4%) foram diagnosticados pela triagem neonatal na Bahia e quatro (3,6%) obtiveram o diagnóstico pela triagem neonatal em outros estados do país (Goiás, Rondônia, Paraná e São Paulo), porém pertenciam a famílias originárias do estado da Bahia. Em 13 dos 99 núcleos familiares identificados (13,1%) havia mais de um caso de HPA diagnosticado. Em 85,6% dos casos, as crianças procediam de municípios do interior do estado, sobretudo da região nordeste da Bahia

Dentre os 87 pacientes diagnosticados por triagem neonatal no SRTN da Bahia, em dezessete (19,5%) não estavam disponíveis dados referentes a pelo menos uma das datas utilizadas para avaliação do programa. A tabela 2 descreve os intervalos de tempo decorridos com respeito às diversas etapas do processo de triagem, desde a coleta até a realização da primeira consulta, apenas para os pacientes que apresentaram diagnóstico confirmado de HPA.

A idade na coleta do teste do pezinho, entre 1998 e 2009, apresentou redução aproximada de dois dias/ano no período ($\beta=-2,18$; $p=0,007$), sendo, em média (DP), de 16,8 (12,9) dias (mediana: 14,0 dias) em 2008-2009 (tabela 2). Contudo, observou-se que, entre os doentes triados no período avaliado, a maioria das coletas (76,8%) encontrava-se fora do período ideal (3 a 7 dias de vida¹⁰), sendo 19,5% acima de 28 dias de vida (portanto fora do período neonatal propriamente dito) e um paciente (1,2%) abaixo de 3 dias de vida. Não houve diferença na idade média de coleta entre as crianças de famílias com e sem outros casos de PKU (27,4 \pm 32,7 *versus* 19,1 \pm 16,2 dias; $p=0,277$) e provenientes da capital ou interior do estado (18,4 \pm 17,6 *versus* 20,7 \pm 20,1 dias; $p=0,403$). Em relação aos vinte pacientes que obtiveram diagnóstico tardio, a média (dp) de idade na primeira consulta no

SRTN foi de 12,2 (9,9) anos de idade, com mediana (p25-p75) de 9,6 (4,8 – 17,6) anos e variação de 2,6 a 35,5 anos. Entre estes, doze (66,0%) tinham outros casos na família e 17 (85,0%) tiveram diagnóstico de PKU clássica.

Foi evidenciada redução no tempo de busca ativa entre os anos de 2001 e 2009 ($\beta=-3,315$; $p=0,036$) e de acordo com a gravidade do fenótipo bioquímico ($\beta=-18,078$; $p<0,001$).

A idade da primeira consulta apresentou redução média de cerca de três dias/ano entre o início do programa e o ano de 2009 ($\beta=-2,915$; $p=0,016$), conforme ilustrado na figura 2. Nos últimos dois anos a média (DP) da idade das crianças na primeira consulta foi de 51,1(22,6) dias, variando de 25 a 74 dias, com mediana de 42 dias. Contudo, estes intervalos variaram de acordo com o fenótipo bioquímico (Tabela 2), sendo significativamente menores para os pacientes com diagnóstico de PKU clássica ($\beta=-21,483$; $p<0,001$).

DISCUSSÃO

Avaliando o “Teste do Pezinho”, nos primeiros 17 anos de sua disponibilização à população da Bahia, observou-se que o programa atingiu, recentemente, a inclusão de todos os municípios do estado, meta desejável para o PNTN. Esta evolução se deu principalmente nos primeiros anos após a implantação do PNTN, uma vez que, em 2003, 94,5% dos municípios baianos já estavam afiliados ao programa¹. A dificuldade em atingir todos os municípios do estado, devido às grandes extensões territoriais e às dificuldades de integração da rede de assistência à saúde, é um problema descrito em diferentes regiões do país.^{18,15,***} Neste estudo foi possível demonstrar aumento do número dos postos de coleta, no período em que este dado esteve disponível (entre 2003 e 2009), indicador com impacto direto na cobertura do programa, pois permite melhor acesso da população ao exame. Em relação à cobertura populacional, esta universalidade plena ainda não foi atingida, mas o índice encontrado no presente estudo (90,81%) demonstra que a cobertura melhorou acentuadamente no período avaliado (2,2% em 1992),

*** Secretaria Estadual de Saúde do Piauí (SESAPI). Teste do Pezinho alcança cobertura de 172 municípios. <http://www.saude.pi.gov.br/noticia.php?id=0000001401> (accessed on 12/Nov/2007).

sendo a mais elevada na região nordeste do país e estando próxima de atingir a meta de 100% dos NV do estado. Segundo dados do Ministério da Saúde, as coberturas mais elevadas em 2007 foram: na região Sul, 103,63% no Paraná, no Sudeste 88,7% em Minas Gerais, no Centro-oeste 85,4% em Goiás e no Norte 88,02% em Rondônia. No Nordeste, a menor cobertura registrada neste período foi a de Pernambuco (52,6%)^{†††}. Aspectos econômicos, sociais e desinformação das famílias sobre o objetivo e a importância da triagem neonatal podem contribuir para a existência de NV não cobertos pelo programa.^{6,16} Além disso, pode existir uma certa subestimativa do número de testes realizados, uma vez que os laboratórios privados não contribuíram com os dados de coleta para o SRTN.

Os dados referentes à incidência das HPA (1:16.362 NV, considerando-se os últimos três anos) são compatíveis com os dados da literatura.⁸ Porém, a prevalência observada (1:126.319 habitantes) não reflete a realidade, devendo ser mais elevada, pois o aumento progressivo da cobertura do "teste do pezinho" desde 1992, revela um crescimento substancial no número de casos detectados. Logo, muitos casos de HPA não diagnosticados existem e são possivelmente confundidos com transtorno de hiperatividade com déficit de atenção, epilepsia idiopática, autismo ou deficiência mental de etiologia não esclarecida.^{14,11} Desta forma, considerando a população residente no estado da Bahia em 2010, avaliada pelo último censo do IBGE ^{†††} em 14.021.432 habitantes, supõe-se como número real atual de casos da HPA no estado em cerca de 857 afetados.

O percentual de coleta do teste do pezinho na idade ideal permaneceu baixo no período avaliado, apesar da melhora na média de idade na coleta. Entre 1992 e 2009, percebe-se que apenas 23,2% das coletas foram realizadas no período ideal, fato observado em 22,2% dos doentes nos últimos dois anos. O Ministério da Saúde recomenda como idade ideal para a coleta do teste do pezinho o período até sete dias de vida, estabelecendo como aceitável a coleta realizada entre oito e 30 dias e definindo como inadequada a coleta realizada após o 30º dia de vida.^{§§§} Em relação à triagem para HPA, a coleta deve ser realizada preferencialmente entre o terceiro e o sétimo dia de vida, pois antes do terceiro dia o recém-nascido ainda não ingeriu

^{†††} http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/INDICADORES_TRIAGEM_NEONATAL.pdf

^{†††} http://www.censo2010.ibge.gov.br/dados_divulgados/index.php

^{§§§} Ministério da Saúde. Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Brasília: Ministério da Saúde; 2004

proteína suficiente para ser detectada ao exame, havendo risco de resultado falso-negativo ⁷, e após o 7º dia as etapas operacionais (envio, processamento, busca ativa) podem postergar o início do tratamento para além do período ideal (dentro do 1º mês de vida da criança).¹¹

Observa-se que o tempo de retenção da amostra, ou seja, o período entre a realização da coleta e o recebimento da amostra pelo laboratório, com média de 9,3 dias nos últimos anos, responde por parte significativa da demora para o paciente chegar à primeira consulta. Este tempo tem melhorado desde a implantação do programa – enquanto que no período de 2002-2004 chegou até 83 dias, o máximo observado em 2008 e 2009 foi de 25 dias.

O tempo decorrido para a liberação dos resultados alterados, pelo laboratório do SRTN, foi em média de 5,2 dias (mediana 5,0 dias), incluindo o tempo de cadastro das amostras no sistema, mostrando um ótimo padrão de qualidade, que se mantém relativamente estável ao longo dos anos.

Já o tempo denominado de “busca ativa” (intervalo de tempo entre a liberação do resultado pelo laboratório e o comparecimento da criança à consulta), mostrou-se bastante elevado quando avaliado para todos os tipos de HPA, quando analisadas em conjunto. Contudo, este tempo varia conforme o fenótipo, em virtude dos diferentes procedimentos de reconvocação ^{****}, tendo sido, em média, de 10,8 dias para a PKU clássica (o fenótipo mais grave), com mediana de 9,0 dias, nos últimos anos. Os casos de PKU leve mostraram média elevada, o que se deve provavelmente à flutuação inicial dos níveis de fenilalanina que ocorre nestes casos, de modo que em avaliação de primeira amostra de sangue apresentam-se como HPA não PKU, fenótipo que, por não necessitar de tratamento imediato, indica repetição do teste antes da primeira consulta. Todavia, diante dos resultados ora descritos, sugere-se revisão destes procedimentos, já que a solicitação de re-coleta retardou a realização da primeira consulta, nestes casos.

A idade da criança com diagnóstico de HPA na primeira consulta no SRTN e, portanto, no início do tratamento, nos casos de PKU clássica e PKU leve também

**** Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador. Manual de Práticas do Programa de Triagem Neonatal na Bahia. Salvador: Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador; 2010

evidenciou evolução positiva do programa ao longo dos anos. A média de idade na primeira consulta, no período 1998 a 2001, era de 78 dias, enquanto que nos anos de 2008 e 2009 foi de 51,1 dias. Embora a avaliação por cada fenótipo mostre redução diretamente proporcional à gravidade, a idade do início do tratamento encontra-se, atualmente, acima do recomendado, mesmo para os casos de PKU clássica. Tal inadequação pode levar a impacto negativo no objetivo principal da triagem neonatal para HPA, que é a prevenção da deficiência mental.¹⁵

Para ser efetiva, a triagem neonatal para PKU necessita de sistema integrado, complexo e multidisciplinar. O processo inclui desde a realização da coleta do exame em período adequado, transporte em tempo hábil e condições satisfatórias, análise laboratorial rápida e contato imediato para confirmação diagnóstica, instalação precoce do tratamento e acompanhamento dos pacientes afetados.¹⁷ A idade tardia na coleta, acrescida de atraso no envio de amostras por parte do posto de coleta (retenção de amostras), e das dificuldades no deslocamento da criança até o SRTN, resulta em impacto direto na idade do paciente na primeira consulta, e consequente prejuízo no tratamento.³

A observação de maior parte dos pacientes ser oriunda do interior do estado reforça a importância da continuidade do PNTN disponível na rede pública, com coleta descentralizada, e procedimentos interligados em uma rede bem estruturada, bem como seu aprimoramento através de maiores investimentos em suas ações.

As grandes diferenças geográficas e culturais entre os diversos estados do Brasil dificultam a generalização e comparação dos dados. Faz-se necessário e de fundamental importância a realização de outros trabalhos dessa natureza, além da avaliação das ações que são realizadas pelos programas de saúde pública, e consequentemente, dos resultados dessas ações na sociedade.

CONCLUSÃO

A triagem neonatal para HPA na Bahia, em 17 anos de existência, evoluiu de forma a realizar significativas melhoras em importantes aspectos,

contribuindo para a melhoria da saúde pública no estado. Destaca-se a adesão de todos os municípios ao programa na Bahia, aumento do número de postos de coleta e aumento progressivo da cobertura populacional, ultrapassando a percentagem dos 90%.

Porém, alguns outros aspectos, apesar de apresentarem relativas melhoras ao longo deste período, precisam e devem ser aprimorados para cumprir o estabelecido pelo Ministério da Saúde aos SRTN. Neste sentido, especial atenção deve ser dada à idade das crianças no momento da coleta e ao tempo entre a coleta e o envio das amostras ao laboratório. Portanto, a padronização e o controle de qualidade das ações de coleta e de treinamento das equipes podem diminuir o ônus do serviço e garantir uma melhor efetividade do programa, com redução da idade na 1ª consulta e conseqüente início precoce do tratamento, garantindo a prevenção efetiva da deficiência mental e permitindo que as crianças baianas com HPA cresçam para se tornar cidadãos saudáveis e produtivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida AM, Godinho TM, Teles MS, Rehem APP, Jalil HM, Fukuda TG, et al. Avaliação do Programa de Triagem Neonatal na Bahia no ano de 2003. *Rev Bras Saúde Mater Infant.* 2006;6:85-91.
2. Amorim T, Gatto SPP, Boa-Sorte N, Leite MEQ, Fontes MIMM, Barretto J, et al. Aspectos clínicos da fenilcetonúria em serviço de referência em triagem neonatal da Bahia. *Rev Bras Saúde Mater Infant.* 2005;5:457-62.
3. Barretto JR, Silva LR, Leite ME, Boa-Sorte N, Pimentel H, Purificação AC, et al. Poor zinc and selenium status in phenylketonuric children and adolescents in Brazil. *Nutr Res.* 2008 Mar;28(3):208-11.
4. Bik-Multanowski M, Didycz B, Mozrzymas R, Nowacka M, Kaluzny L, Cichy W, et al. Quality of life in noncompliant adults with phenylketonuria after resumption of the diet. *J Inherit Metab Dis.* 2008 Oct.
5. Blau N, Bonafé L, Blaskovics ME. Disorders of Phenylalanine and Tetrahydrobiopterin Metabolism. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM, editors. *Physicians' Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases.* 2nd ed. Berlin: Springer; 2005. p. 89-106.
6. Botler J, Camacho LAB, Cruz MMd, George P. Triagem neonatal: o desafio de uma cobertura universal e efetiva. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2010;15:493-508.

7. Brandalize SRC, Czeresnia D. Avaliação do programa de prevenção e promoção da saúde de fenilcetonúricos. *Rev Saúde Pública*. 2004;38:300-6.
8. Carvalho T. Resultados do levantamento epidemiológico da sociedade brasileira de triagem neonatal (SBTN). *Rev Med Minas Gerais*. [Abstract]. 2003;13(2 suppl):s 109-35.
9. de Carvalho T, dos Santos H, dos Santos I, Vargas P, Pedrosa J. Newborn screening: A national public health programme in Brazil. *J Inherit Metab Dis*. 2007 AUG 2007:615-.
10. Hardelid P, Cortina-Borja M, Munro A, Jones H, Cleary M, Champion M, et al. The birth prevalence of PKU in populations of European, South Asian and Sub-Saharan African ancestry living in South East England. *Ann of Hum Genet*. 2008 JAN 2008:65-71.
11. Leão LL, Aguiar MJB. Triagem neonatal: o que os pediatras deveriam saber. *J Pediatr*. 2008;84:S80-S90.
12. Mira NV, Marquez UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev Saúde Pública*. 2000;34:86-96.
13. Monteiro LTB, Cândido LMB. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev Nutr*. 2006;19:381-7.
14. Murphy G, Johnson S, Amos A, Weetch E, Hoskin R, Fitzgerald B, et al. Adults with untreated phenylketonuria: out of sight, out of mind. *British Journal of Psychiatry*. 2008 DEC 2008:501-2.
15. Ramalho RJR, Ramalho ARO, Oliveira CRP, Aguiar-Oliveira MH. Evolução do programa de triagem neonatal para o hipotireoidismo congênito e fenilcetonúria no Estado de Sergipe de 1995 a 2003. *Arq Bras de Endocrinol Metab*. 2004;48:890-6.
16. Reichert APS, Pacífico VC. Conhecimento de mães quanto à importância do teste do pezinho/ Understanding of mothers as to the importance of the pku test. *Rev Bras Enferm*. 2003;56(3):226-9.
17. Souza CFM, Schwartz IV, Giugliani R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2002;7:129-37.
18. Stranieri I, Takano OA. Avaliação do Serviço de Referência em Triagem Neonatal para hipotireoidismo congênito e fenilcetonúria no Estado de Mato Grosso, Brasil. *Arq Bras de Endocrinol Metab*. 2009;53:446-52.
19. Vilarinho L, Queiros A, Leandro P, Almeida IT, Riveira I. Fenilcetonúria revisitada. *Arq Med* [online] [serial on the Internet]. 2006; 20(5-6): Available from:

http://www.scielo.oces.mctes.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-34132006000400003&lng=pt&nrm=iso.

Tabela 1 - Número de nascidos vivos, testes realizados, cobertura e incidência de HPA entre 1992 e 2009. Serviço de Referência em Triagem Neonatal da Bahia (APAE Salvador).

Ano	Nascidos Vivos ¹	Testes realizados ²	Postos de coleta ²	Cobertura (%)	Casos de HPA ³	Incidência ⁴
1992	180.917	3.946	ND	02,18	0	0
1993	186.433	29.729	ND	15,94	0	0
1994	141.343	39.136	ND	27,69	0	0
1995	163.494	45.700	ND	27,95	0	0
1996	198.253	44.725	ND	22,56	0	0
1997	229.256	48.350	ND	21,09	0	0
1998	234.630	61.257	ND	26,11	4	1:58.657
1999	242.721	71.842	ND	29,60	2	1:121.360
2000	239.530	71.384	ND	29,80	1	1:239.530
2001	235.725	91.690	ND	38,90	3	1:78.575
2002	237.375	132.815	748	59,13	7	1:33.910
2003	239.017	169.670	973	70,59	8	1:29.877
2004	234.454	175.456	1166	76,21	11	1:21.314
2005	231.065	188.459	1415	81,59	9	1:25.674
2006	220.187	188.823	1682	88,17	6	1:36.698
2007	220.398	190.279	1996	86,89	13	1:16.954
2008	219.123	191.873	2202	87,56	13	1:16.855
2009	213.854	194.195	2264	90,81	14	1:15.276

ND = Não Disponível; HPA = Hiperfenilalaninemia;

¹Dados obtidos do IBGE (1992 e 1993), DATASUS (1994 a 2007) e SESAB (2008 e 2009). Acesso em 02/01/2011;

²Dados obtidos nos relatórios operacionais do SRTN (APAE Salvador);

³Casos triados e confirmados pelo SRTN (APAE Salvador). Não inclui diagnósticos tardios de PKU;

⁴Descrito como caso:nascidos vivos.

Figura 1 – Prevalência de casos de HPA, por municípios baianos, por 100.000 habitantes, no ano de 2009.

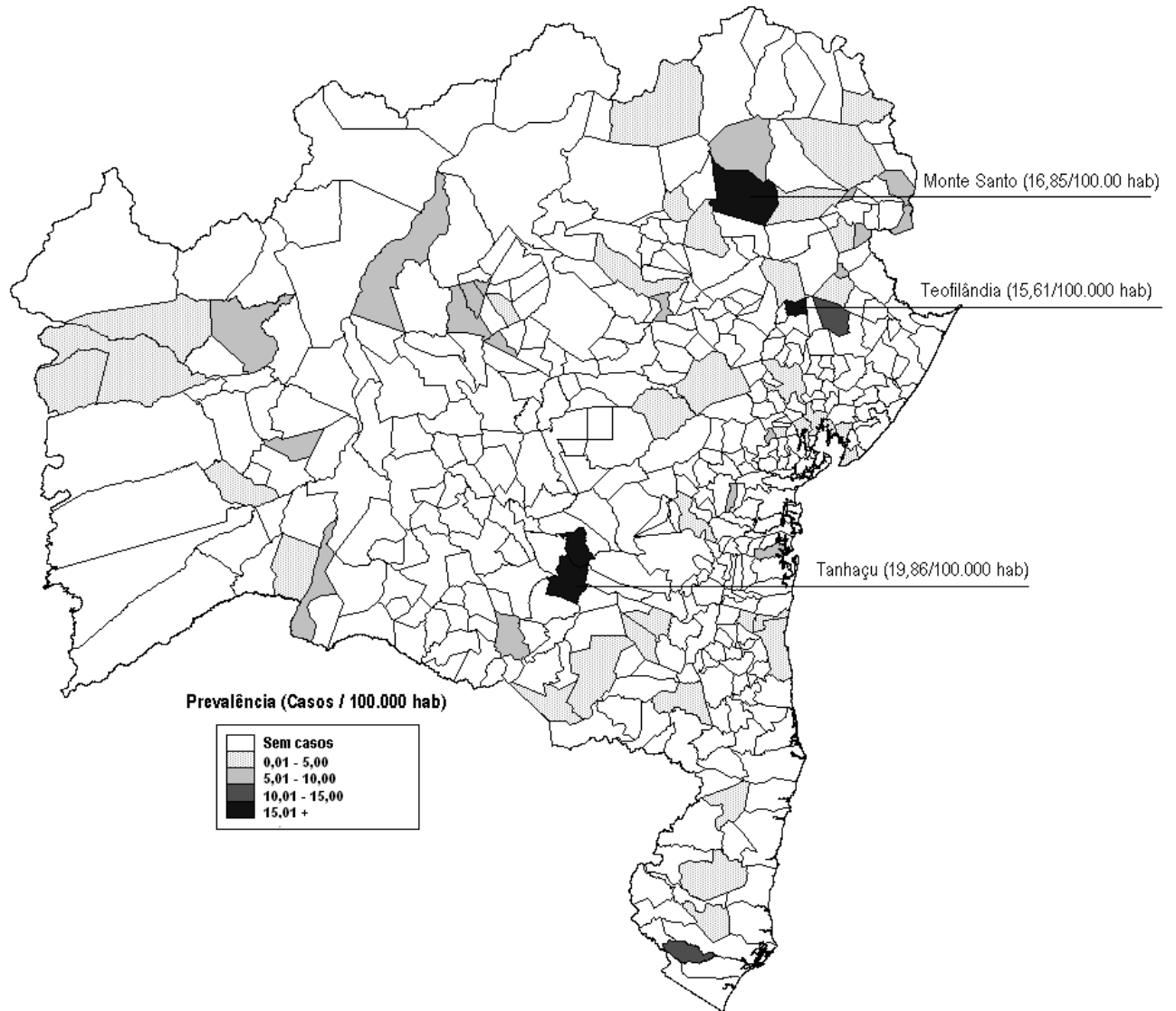


Tabela 2 – Dados operacionais das etapas da Triagem Neonatal para os pacientes triados e confirmados com HPA entre 1998 e 2009. Serviço de Referência em Triagem Neonatal da Bahia (APAE Salvador).

Variáveis Operacionais	N [§]	Tempo (dias)			
		Min	Max	Média (DP)	Mediana (p25-p75)
Tempo nascimento-coleta*	82	2,0	130,0	20,4 (19,7)	14,5 (7,8 – 25,3)
1998 – 2001	04	39	130,0	71,0 (41,8)	57,5 (40,3 – 115,3)
2002 – 2004	23	2,0	41,0	17,3 (10,2)	17,0 (10,0 – 25,0)
2005 – 2007	28	3,0	76,0	19,4 (18,0)	13,0 (7,0 – 26,0)
2008 – 2009	27	3,0	54,0	16,8 (12,9)	14,0 (8,0 – 21,0)
Tempo de retenção de amostra	70	0	83,0	11,5 (13,4)	8,0 (5,0 – 11,5)
2002 – 2004	15	2,0	83,0	15,1 (20,1)	8,0 (4,0 – 19,0)
2005 – 2007	28	4,0	79,0	11,8 (13,9)	8,5 (6,0 – 11,0)
2008 – 2009	27	0,0	28,0	9,3 (6,7)	7,0 (5,0 – 11,0)
Tempo de processamento/resultado	70	0	23,0	5,2 (3,5)	5,0 (3,0 – 7,0)
2002 – 2004	15	0,0	15,0	6,4 (3,5)	7,0 (4,0 – 8,0)
2005 – 2007	28	0,0	9,0	4,1 (2,9)	4,0 (1,3 – 6,0)
2008 – 2009	27	2,0	23,0	5,6 (3,9)	5,0 (3,0 – 6,0)
Tempo de busca ativa**	71	3	161,0	24,0 (29,5)	15,0 (6,0 – 28,0)
2002 – 2004	15	3,0	161,0	36,1 (51,7)	10,0 (6,3 – 54,3)
2005 – 2007	28	3,0	91,0	21,6 (21,4)	13,5 (5,0 – 29,8)
2008 – 2009 ^{§§}	27	3,0	72,0	19,4 (14,6)	19,0 (8,0 – 25,0)
PKU Clássica	10	3,0	25,0	10,8 (7,2)	9,0 (4,8 – 16,3)
PKU leve	05	7,0	72,0	28,6 (26,2)	27,0 (8,0 – 50,0)
HPA não-PKU	11	18,0	45,0	24,5 (8,0)	21,0 (19,0 – 30,0)
Idade na 1ª consulta**	85	22,0	202,0	59,7 (35,3)	49,0 (34,5 – 76,0)
1998 – 2001	07	32,0	150,0	71,1 (40,2)	73,0 (40,0 – 84,0)
2002 – 2004	23	22,0	202,0	69,7 (48,1)	53,0 (39,0 – 84,0)
2005 – 2007	28	23,0	129,0	56,9 (30,7)	48,0 (33,5 – 74,3)
2008 – 2009 ^{§§}	27	25,0	109,0	51,1 (22,6)	42,0 (31,0 – 69,0)
PKU Clássica	10	25,0	74,0	39,6 (15,3)	34,5 (29,3 – 45,8)
PKU leve	05	26,0	92,0	50,6 (26,0)	52,0 (28,5 – 72,0)
HPA não-PKU	11	38,0	109,0	63,6 (22,4)	65,0 (39,0 – 81,0)

HPA = Hiperfenilalaninemia; DP = desvio-padrão; Min = mínimo; Max = máximo; p25 = percentil 25; p75 = percentil 75; intervalo interquartil;

[§]o número de pacientes para cada variável oscilou de acordo com a disponibilidade dos dados em prontuário e nos registros do SRTN; ^{§§}os dados por fenótipo bioquímico se referem apenas aos anos de 2008-2009;

*p=0,025 para comparação entre os períodos de tempo utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis;

**p<0,001 para comparação entre os grupos de fenótipo bioquímico utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal Wallis.

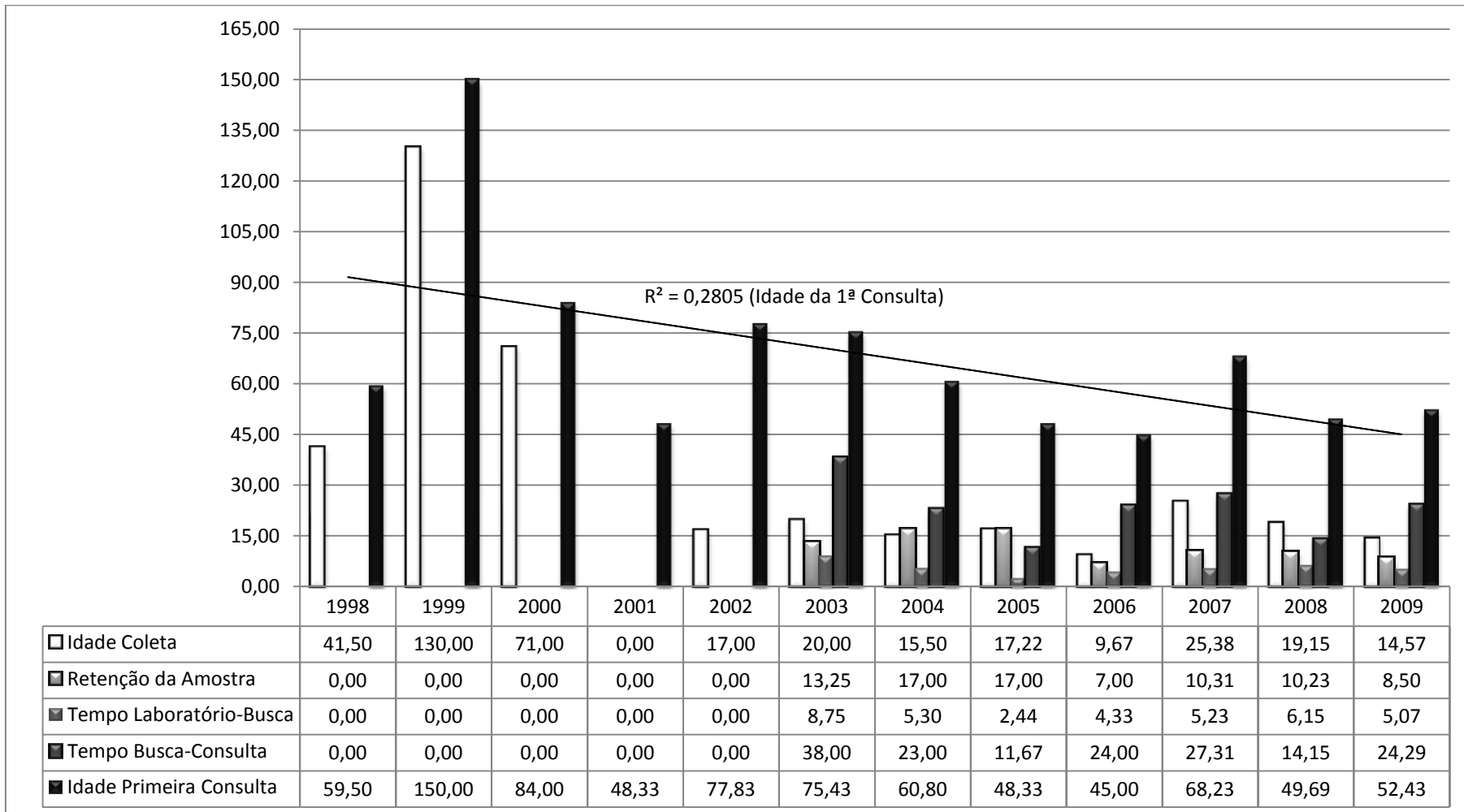


Figura 2 – Distribuição dos tempos operacionais (em dias) nas diversas etapas da triagem neonatal entre os doentes triados para HPA no SRTN da Bahia nos anos de 1998 a 2009.

**ARTIGO 2 - ASPECTOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DA FENILCETONÚRIA
NA BAHIA - BRASIL**

*CLINICAL AND DEMOGRAPHIC ASPECTS OF PHENYLKETONURIA IN BAHIA -
BRAZIL*

Tatiana Amorim, Ney Boa-Sorte, Maria Efigênia Q. Leite, Angelina Xavier Acosta

- Este artigo corresponde ao proposto no Objetivo Geral nº 3 - Descrever as características clínicas e demográficas dos pacientes com diagnóstico de PKU ou HPA não-PKU acompanhados no SRTN da Bahia.
- Situação do artigo: submetido para publicação na Revista Paulista de Pediatria

**ASPECTOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DA FENILCETONÚRIA NA BAHIA -
BRASIL**

CLINICAL AND DEMOGRAPHIC ASPECTS OF PHENYLKETONURIA IN BAHIA -
BRAZIL

Tatiana Amorim^I; Ney Boa-Sorte^{II}; Maria Efigênia Q. Leite^{III}; Angelina X. Acosta^{IV}.

^I Doutora; Coordenadora do Núcleo de Pesquisa Científica (NUPEC) da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador (APAE Salvador), Professora Assistente de Genética Médica da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

^{II} Mestre; Assessor Científico no NUPEC/APAE Salvador, Professor Assistente de Epidemiologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

^{III} Mestre; Nutricionista do Serviço de Referência em Triagem Neonatal /APAE Salvador

^{IV} Doutora; Professora Adjunta de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia – Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Autor correspondente (Corresponding Author): Tatiana Amorim

Endereço: Alameda Verona, 32, Pituba, Salvador, Bahia, Brasil, CEP 41.430-465

Tel: 71 3270 8302 / Fax: 71 3353 0954

e-eco: amorim.tatiana@uol.com.br

Instituição: Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador (APAE Salvador)

Declaração de Conflito de Interesse: nada a declarar

Fonte Financiadora: Fundação de amparo a Pesquisa do estado da Bahia (FAPESB)

– processo nº: 6174/2009

RESUMO

A fenilcetonúria foi o primeiro erro inato do metabolismo implicado na etiologia da deficiência mental. Assim, desde a década de 60 realiza-se triagem neonatal para esta patologia. Na Bahia, a triagem neonatal para fenilcetonúria iniciou em 1992. OBJETIVO: descrever as características clínicas e demográficas dos pacientes com diagnóstico de Hiperfenilalaninemia acompanhados no Serviço de Referência em Triagem Neonatal da Bahia. MÉTODO: estudo transversal incluindo 99 famílias (111 afetados) com fenótipo bioquímico de fenilcetonúria. RESULTADOS: dentre os pacientes acompanhados, 82% foram diagnosticados pela triagem neonatal e, em onze famílias, havia mais de um caso. Fenilcetonúria clássica foi diagnosticada em 63 (56,8%) pacientes e houve um caso de deficiência de tetrahydrobiopterina. Entre os triados, a mediana de idade na primeira consulta foi 39,5 dias (fenilcetonúria clássica). 34% dos pacientes apresentavam sintomatologia nesta consulta, nenhum deles com atraso no desenvolvimento neuro-psico-motor. Dentre os 417 municípios da Bahia, 14,6% apresentavam pelo menos um caso, com concentração na região nordeste (9,9%) e capital do estado (14,4%). Consanguinidade foi descrita em 32,2% e houve predomínio de pacientes classificados como brancos (63%). Os pais tinham baixa escolaridade (64,1% das genitoras sem ensino fundamental completo) e baixa renda (69,5% com renda familiar abaixo de dois salários mínimos). CONCLUSÕES: os resultados evidenciam presença de consanguinidade e recorrência familiar, reforçando a importância de investigação familiar ampla para identificar casos tardios que podem se beneficiar de tratamento. Além disso, a redução da idade no início do tratamento também é fundamental para adequação do programa.

Palavras-chave: fenilcetonúria, triagem neonatal, erro inato do metabolismo.

ABSTRACT

Phenylketonuria was the first inborn error of metabolism implicated in mental deficiency etiology. Because of this, since the 60's there is neonatal screening for this disease. In Bahia, Brazil, neonatal screening for Phenylketonuria began in 1992. OBJECTIVE: to describe clinical and demographic characteristics of patients diagnosed with hyperphenylalaninemia followed at Reference Service for Neonatal Screening of Bahia. METHODS: cross-sectional study including 99 families (111 affected) with hyperphenylalaninemia biochemical phenotype. RESULTS: among the

patients treated, 82% were diagnosed by neonatal screening, and in eleven families, there were more of a case. Classical Phenylketonuria was diagnosed in 63 (56.8%) patients and there was a case of deficiency tetrahydrobiopterin. Among those screened, the median age at first visit was 39.5 days (classical Phenylketonuria), and 32.4% of patients had symptoms at this consultation, none with delayed development neuro-psycho-motor. Among the 417 municipalities of Bahia, 14.6% had at least one case, with a concentration in the northeastern region (9.9%) and capital of state (14.4%). Consanguinity was reported in 32.2% and there was a predominance of patients classified as white (63%). Parents had low education (64.1% of mothers without completed elementary education) and poor income (69.5% with family income below two minimum wages). CONCLUSIONS: The results show presence of consanguinity and familial recurrence, reinforcing the importance of broad family investigation to identify cases that may benefit from treatment. Moreover, the reduction of age at start of treatment is also crucial to better adapt the program.

Keywords: phenylketonuria, neonatal screening, inborn error of metabolism.

INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU) é um erro inato do metabolismo, de herança autossômica recessiva, tendo sido descrita inicialmente em 1934, pelo químico norueguês Asbjorn Fölling, sendo o primeiro distúrbio metabólico hereditário implicado na etiologia da deficiência mental (DM) ⁽¹⁾. O defeito bioquímico subjacente a esta patologia, na grande maioria dos casos, é a deficiência da enzima fenilalanina-hidroxilase (PAH), responsável pela conversão hepática de fenilalanina em tirosina ⁽²⁾, com acúmulo de fenilalanina e seus metabólitos tóxicos nos tecidos, especialmente o Sistema Nervoso Central (SNC). A PAH humana é codificada por um gene localizado no cromossomo 12 (12q22-q24), já tendo sido descritas até o momento mais de 500 diferentes mutações neste *locus* ⁽³⁾.

Desde a década de 1950 se conhecem estratégias para o manejo dietoterápico da patologia, sendo o grande desafio iniciar o tratamento no período pré-sintomático. Como resposta a esta necessidade, o rastreamento neonatal para a PKU teve início na década de 60 ⁽⁴⁾, chegando ao Brasil na década de 70 ⁽⁵⁾. Conhecido popularmente em nosso país como "Teste do Pezinho", o teste de

triagem neonatal permitiu a prevenção amplamente eficaz da DM ^(6,7) associada à PKU.

Na Bahia, a realização do "Teste do Pezinho" teve início em 1992 na Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) de Salvador, que se tornou Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN), credenciado pelo Ministério da Saúde, em 2001. A frequência observada de PKU na Bahia foi descrita como sendo de um caso a cada 22.000 nascidos vivos (NV)/ano ⁽⁸⁾.

As hiperfenilalaninemias (HPA) podem ser classificadas em PKU clássica, PKU leve ou HPA não-PKU, a depender do nível de fenilalanina sérica ao diagnóstico, fornecendo uma estimativa da atividade enzimática residual, o que é em parte dependente da mutação presente no gene da PAH e permite a definição do fenótipo bioquímico. Outro fenótipo possível, denominado PKU atípica, ocorre por deficiência na biossíntese ou regeneração do cofator da PAH, a tetrahydrobiopterina (BH4), não havendo nestes casos mutações no gene da PAH. A deficiência de BH4 é responsável por um fenótipo neurológico grave, que não responde ao tratamento dietético padrão ⁽²⁾.

Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever as características clínicas e demográficas dos pacientes com diagnóstico de PKU ou HPA não-PKU acompanhados no SRTN da Bahia.

MÉTODOS

Amostra: foram incluídos no estudo 99 famílias (total de 111 afetados), com fenótipo bioquímico de PKU, definido como fenilalanina (Fal) sérica $\geq 10\text{mg/dL}$, ou de HPA-não PKU, definido como níveis de Fal entre 3,5 e 9,9mg/dL (Tabela 1). O diagnóstico de PKU atípica foi estabelecido após dosagem de biopterinas em sangue e urina e teste de sobrecarga de BH4 ⁽⁹⁾. Foram estudados pacientes diagnosticados por triagem neonatal e também aqueles cujo diagnóstico foi tardio, obtido por suspeita clínica.

Tabela 1 - Classificação bioquímica das hiperfenilalaninemias.

Fenótipo Bioquímico	Fal sérica (mg/dL)	Atividade enzimática estimada (%)	Tratamento
PKU clássica	> 20	< 1	Sim
PKU leve	10-20	1-3	Sim
HPA não-PKU	3,5-10	>3	Não

Fonte: adaptado de Martins A. Inborn errors of metabolism: a clinical overview (Martins, 1999).

Dados clínico-demográficos: foram coletados dados, através de protocolo clínico, referentes a sexo, idade no início do tratamento, presença de outros afetados na família, naturalidade, grupo racial através de classificação fenotípica realizada por profissional treinado, usando os critérios estabelecidos por Krieger ⁽¹⁰⁾, consanguinidade parental, forma do diagnóstico (triagem neonatal ou doença estabelecida clinicamente), fenótipo bioquímico e presença de sinais e sintomas no momento do diagnóstico (foram avaliados irritabilidade, despigmentação cutânea/de cabelos, retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, distúrbios de comportamento ou odor urinário peculiar). O estudo foi descritivo transversal, tendo o banco de dados sido montado e analisado usando o pacote estatístico SPSS[®] versão 11.0. A análise estatística incluiu medidas de distribuição de frequências, tendência central e dispersão.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - Bahia), e os responsáveis legais pelos pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

RESULTADOS

Foram avaliados os afetados de 99 famílias, com um total de 111 indivíduos com PKU clássica ou leve, PKU atípica ou HPA não-PKU. Houve preponderância do

gênero feminino na população estudada, com 52,3% (58) de meninas. O diagnóstico foi realizado através de triagem neonatal em 91 casos (82,0%) e através de doença clínica (sendo a principal manifestação deficiência mental, variando de leve a grave) em 20 pacientes (18,0%). Em onze núcleos familiares (11,1%) havia mais de um afetado. Destes núcleos, em uma família ambos os casos foram diagnosticados por suspeita clínica; outras duas famílias tiveram caso suspeito e confirmado após triagem populacional em região de alta prevalência. Em outras três famílias o segundo afetado nasceu após o primeiro já ter sido diagnosticado por triagem neonatal e, em outra, o irmão era um gemelar, tendo, portanto, diagnóstico e tratamento também precoces. Nos casos restantes, o diagnóstico tardio se deu após a triagem neonatal de irmão mais jovem.

A classificação do fenótipo bioquímico, baseada nos níveis de fenilalanina ao diagnóstico, estabeleceu a PKU clássica em 63 pacientes (56,8%), PKU leve em 25 (22,5%), HPA - não PKU em 22 (19,8%) pacientes e PKU atípica por deficiência de cofator (PTPS) em um caso. A informação sobre idade de início do tratamento estava disponível para 85 pacientes diagnosticados por triagem neonatal, e encontra-se sumarizada na tabela 2.

Tabela 2 – Idade do início do tratamento, em dias de vida, dos pacientes com diagnóstico de HPA por triagem neonatal no SRTN - Bahia

Idade na 1 ^a consulta	Nº	mínimo	máximo	média (dp)	mediana (p25-p75)
Geral	85	22	202	59,7 (35,3)	49,0 (34,5 – 76,0)
PKU Clássica	40	22	150	44,7 (23,6)	39,5 (29,3 – 50,5)
PKU leve	23	24	196	67,7 (38,7)	53,0 (41,0 – 91,0)
HPA não-PKU	21	38	202	80,8 (38,3)	76,0 (53,5 – 99,0)

Quanto à presença de sintomas ao diagnóstico, todos os pacientes com diagnóstico tardio apresentavam sintomas da doença. Esta informação estava disponível para 68 dos 70 pacientes diagnosticados precocemente (através de triagem neonatal) como afetados por PKU leve ou clássica, e entre estes 22 (32,4%)

também já apresentavam sinais e sintomas, sendo os mais frequentes a irritabilidade, caracterizada principalmente como dificuldade para dormir e se alimentar, e choro frequente. Atraso do DNPM não foi observado na primeira consulta de pacientes diagnosticados por triagem neonatal. Os 22 pacientes com diagnóstico de HPA-não PKU mantêm acompanhamento regular, em dieta não restritiva, conforme recomenda a literatura ⁽²⁾.

O único paciente com diagnóstico de PKU atípica apresentou evolução clínica desfavorável nos primeiros meses de vida, com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor evidente após o 3º mês, tendo havido suspeita clínica e diagnóstico laboratorial desta condição.

Os casos diagnosticados são oriundos de 61 diferentes municípios, sendo Monte Santo, na região nordeste do Estado, o município que apresenta maior número, com nove pacientes diagnosticados. A capital do estado (Salvador) responde por 14,4%% (16/111) do total de famílias diagnosticadas. Informação sobre consanguinidade entre os pais esteve disponível em 90 famílias, tendo sido referida como presente em 32,2% (29/99) das famílias. A classificação racial fenotípica foi realizada em 100 pacientes, tendo sido 63 classificados como brancos, 32 como mulatos, dois como índios e o mesmo número como pretos.

Informações sobre o estado sócio-econômico, avaliado no momento da entrada da criança no serviço, estiveram disponíveis para 94 das famílias, e demonstraram que 10,6% não possuíam renda fixa, 40,4% tinham renda familiar ente zero e um salário-mínimo (SM), 25,5% entre um e dois SM, e apenas 9,6% das famílias tinham renda acima de dois SM. Destaca-se o achado de que, em 13,8% das famílias não havia renda.

Informação sobre o nível de escolaridade dos genitores do paciente esteve disponível para 78,8% das mães e 69,7% dos pais. Estes resultados encontram-se sumarizados na tabela 3. Em geral, as famílias apresentavam baixa escolaridade, com predomínio de genitores com ensino fundamental incompleto.

Tabela 3 – Escolaridade dos pais das crianças com diagnóstico de PKU do SRTN – Bahia.

Escolaridade	Mãe		Pai	
	N	%	N	%
Sem instrução	6	6,1	8	8,1
Ensino fundamental incompleto	44	44,4	44	44,4
Ensino fundamental Completo	8	8,1	5	5,1
Ensino médio	16	16,2	10	10,1
Ensino superior	4	4,0	2	2,0
Sem informação	21	21,2	30	30,3
Total	99	100,0	99	100,0

DISCUSSÃO

O Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) do Estado da Bahia realiza diagnóstico, busca ativa, tratamento e acompanhamento dos pacientes com PKU. Entre os 61 diferentes municípios baianos com casos diagnosticados, os municípios de Monte Santo e Uauá, vizinhos e localizados no norte do estado, e que realizam triagem neonatal de maneira efetiva há poucos anos, mostram concentração de pacientes em acompanhamento. O município de Monte Santo é atualmente sítio de pesquisa em genética de populações, uma vez que concentra altas frequências de algumas doenças genéticas autossômicas recessivas, possivelmente associadas à taxa elevada de consanguinidade da população ⁽¹¹⁾.

Na Bahia, dados do DATASUS estimam, em 2007, um número aproximado de 18.366 nascimentos/mês no estado ⁽¹²⁾. O SRTN tem realizado cobertura de cerca de 90% dos nascimentos na Bahia. A incidência observada foi de um caso de PKU para cada 16.362 nascidos-vivos/ano, nos últimos três anos (Amorim *et al.*, 2010, comunicação pessoal, dados não publicados). Esses números mostram uma frequência superior à esperada, tomando-se por base populações afro-descendentes ⁽¹³⁾. Os casos identificados através de suspeita clínica perfazem cerca de 17% do total de casos diagnosticados até o momento, e seu número tem se reduzido nos últimos anos, sinal talvez dos efeitos da maior cobertura do teste do pezinho. Embora a triagem neonatal seja o método ideal para o diagnóstico da patologia, vale ressaltar que, dada a incidência de PKU no estado, a prevalência observada (um caso a cada 131.869 habitantes) encontra-se provavelmente

subestimada. Explicações para este fato incluem baixa cobertura do teste do pezinho antes de 2001, associada à falta suspeição clínica da patologia ⁽¹⁴⁾.

A avaliação clínica na primeira consulta mostrou presença de sinais e sintomas atribuíveis à hiperfenilalaninemia mesmo em crianças tratadas precocemente. Embora esta informação possa estar superestimada pelo fato do avaliador ter conhecimento prévio do diagnóstico, chama a atenção o fato de que pode haver comprometimento clinicamente evidente, embora habitualmente reversível, antes dos seis meses de idade, como descreve a literatura clássica ^(15, 16, 17, 18).

A presença de recorrência na irmandade do propósito está de acordo com o padrão de herança autossômico recessivo, assim como a alta frequência de consanguinidade entre os pais. Vale ressaltar que a investigação de irmãos com sintomas sugestivos permite o esclarecimento diagnóstico de crianças com deficiência mental de etiologia desconhecida, possibilitando ainda a instituição do tratamento, com bons resultados na otimização do crescimento, redução de sintomas neurológicos e melhora do comportamento social, ainda que não seja mais possível reverter a deficiência cognitiva ^(19, 20, 21). A maior prevalência de pacientes classificados como brancos pode sugerir ancestralidade européia/ caucasóide, o que estaria de acordo com o conhecimento disponível sobre as bases genéticas da fenilcetonúria ⁽⁵⁾.

A idade média de início de tratamento de 44,7 dias (mediana 39,5 dias) para os casos de PKU clássica mostra-se elevada, uma vez que a recomendação é de que o início do tratamento se dê ainda no primeiro mês de vida ⁽⁷⁾. O desvio-padrão de aproximadamente 23 dias reflete o fato de ainda haver pacientes com demora significativa em ter o seu tratamento oportunizado dentro dos limites adequados.

Os dados sócio-econômicos evidenciam a presença de uma população carente, para a qual o PNTN, inteiramente custeado pelo SUS, se reveste de especial importância. Destaca-se que 64,1% das genitoras e 75,4% dos genitores, dentre os que tinham escolaridade informada, não apresentavam ensino fundamental completo. Estes dados se aproximam do especificado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que descreve 60,8% da população baiana como tendo sete anos ou menos de estudo ⁽²²⁾. Os dados de renda familiar das famílias estudadas revelam que, pelo menos 69,5% delas ganham até dois SM mensais. Com um mínimo de quatro membros na família, a renda per capita familiar

já atinge valores de $\frac{1}{2}$ SM, dados compatíveis com a realidade do estado da Bahia, no qual, segundo o IBGE, 66,8% das famílias com crianças de zero a seis anos, tem renda familiar per capita de até $\frac{1}{2}$ salário mínimo ⁽²²⁾. Estes dados reforçam a necessidade de atendimento regular e multiprofissional, incluindo atendimento social e de educação para a saúde como forma de reduzir os agravos potenciais à saúde trazidos pela baixa escolaridade e rendimento familiar.

O presente trabalho descreveu as condições clínicas e demográficas de um grupo de pacientes, que responde por todos os casos com diagnóstico conhecido de Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia no estado da Bahia (uma vez que o SRTN é o único serviço autorizado pelo estado a prescrever o tratamento) até o ano de 2009. Os resultados evidenciam a presença de consanguinidade e recorrência familiar, chamando a atenção para a importância de uma investigação familiar ampla, no intuito de identificar casos tardios (não beneficiados pela triagem neonatal), que podem se beneficiar, ainda que parcialmente, de tratamento. O achado de idade inadequada no início do tratamento também é de fundamental importância para que se estabeleçam estratégias de adequação do programa e reforço no suporte multidisciplinar às famílias, em geral de baixa renda e escolaridade, fatores de risco conhecidos para agravos à saúde.

AGRADECIMENTOS:

Ao Serviço de Referência em triagem Neonatal da APAE Salvador, em especial à Assistentes Sociais Neyla Otero e Daniela Lima pelo apoio na obtenção dos dados

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kahler S, Fahey M. Metabolic disorders and mental retardation. *Am J Med Genet* 2003; 117C: 31-41.
2. Cederbaum S. Phenylketonuria: an update. *Cur Opin Pediatr* 2002; 14: 702-6.
3. PAHdb [homepage on the internet]. Montreal: Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase [cited 2010 Nov 29]. Available from: <http://www.pahdb.mcgill.ca/>
4. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32:338-43.

5. Acosta A. Análise molecular do gene da fenilalanina hidroxilase em pacientes com fenilcetonúria [tese doutorado]. Ribeirão Preto: Departamento de Genética, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2000.
6. Centerwall S, Centerwall W. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics* 2002; 105:120-36.
7. Burgard P. Development of intelligence in early treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000; 159 (Suppl 2): S74-9.
8. Amorim T, Gatto SPP, Boa-Sorte N, Leite MEQ, Fontes MIMM, Barretto J, et al. Aspectos clínicos da fenilcetonúria em serviço de referência em triagem neonatal da Bahia. *Rev Bras Saude Mater Infant* 2005; 5:457-62.
9. Ponzzone A, Guardamagna O, Spada M, Ferraris S, Ponzzone R, Kierat L, et al. Differential diagnosis of hyperphenylalaninemia by a combined phenylalanine-tetrahydrobiopterin loading test. *Eur. J. Pediatr.* 1993; **152**:655-66.
10. Krieger H, Morton NE, Mi MP, Azevêdo E, Freire-Maia A, Yasuda N. Racial admixture in Northeastern Brazil. *Ann Hum Genet* 1965; 29: 113-25.
11. Amorim T, Abé-Sandes K, Castilla E, Grossi G, Vieira T, Queiroz I 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, 195, 2007.
12. Brasil - Ministério de Saúde. Nascidos vivos - Bahia. Nascimentos por residência por ano do nascimento segundo município [on line] 2007. Disponível em URL:<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvba.defA.def>. [2010 Ago 28].
13. Wilcox W, Cederbaum S. Amino acid metabolism. *In*: Emery and Rimoin's Principles and practice of medical genetics. London: C. Livingstone; 2001: p. 2405-40.
14. Dan B, Christiaens F, Mewasingh L, De Laet C, Goyens P. Late-treated phenylketonuria mimicking Angelman syndrome. *Am J Med Genet* 2001; 104: 345-6.
15. Griffiths P, Tarrini M, Robinson P. Executive function and psychosocial adjustment in children with early treated phenylketonuria: correlation with historical and concurrent phenylalanine levels. *J Intellect Disabil Res* 1997; 41: 317.
16. Chang PN, Gray RM, O'Brien LL. Patterns of academic achievement among patients treated early with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000. 159 (Suppl 2): S96-9.

17. Waisbren SE. Comments on cognition and intelligence in phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000; 159 (Suppl 2): S80-1.
18. Huijbregts S, de Sonnevile L, Licht R, van Spronsen F, Sergeant J. Short-term dietary interventions in children and adolescents with treated phenylketonuria: effects on neuropsychological outcome of a well-controlled population. *J Inher Metab Dis* 2002; 25: 419-30.
19. Koch R, Moseley K, Ning J, Romstad A, Guldborg P, Guttler F. Long-term beneficial effects of the phenylalanine- restricted diet in late-diagnosed individuals with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 1999; 67: 148-55.
20. Levy H. Comments on final intelligence in late treated patients with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000; 159 (Suppl 2): S149.
21. Murphy GH, Johnson SM, Amos A, Weetch E, Hoskin R, Fitzgerald B, *et al.* Adults with untreated phenylketonuria: out of sight, out of mind. *The British Journal of Psychiatry* (2008). 193, 501–502.
22. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. PNAD - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios [on line] 2008. **Disponível em URL:**http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ba&tema=pnad_2008. [2010 Ago 28].

ARTIGO 3 - ESTUDO DAS MUTAÇÕES IVS10nt11g-a, V388M, R261Q, R261X, R252W, I65T E R408W NO GENE DA FENILALANINA-HIDROXILASE EM PACIENTES COM FENILCETONÚRIA DO NORDESTE DO BRASIL

STUDY OF IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R261X, R252W, R408W and I65T mutations in the phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria at northeast Brazil

Tatiana Amorim, Thessika Hialla Almeida Araújo, Taise Lima de Oliveira, Erlane Marques Ribeiro, Maria Juliana Rodovalho-Doriqui, Marta Maria Galvão de Sousa Magalhães, Emerson Santana Santos, Angelina Xavier Acosta

- Este artigo corresponde ao proposto no Objetivo Geral nº 1 - Definir as bases moleculares responsáveis pela HPA em indivíduos procedentes dos estados da região nordeste do Brasil; e nos Objetivos Específicos nº 1- Detectar mutações no gene da PAH em indivíduos com diagnóstico de HPA; 2- Descrever da distribuição das mutações do gene da PAH na região nordeste brasileira; e 3- Propor painel de mutações mais comuns em cada estado do nordeste do Brasil, para avaliação individualizada.
- Situação do artigo: em processo de tradução para ser submetido à publicação no periódico *Genetics and Molecular Biology*.

ESTUDO DAS MUTAÇÕES IVS10nt11g-a, V388M, R261Q, R261X, R252W, I65T E R408W NO GENE DA FENILALANINA-HIDROXILASE EM PACIENTES COM FENILCETONÚRIA DO NORDESTE DO BRASIL

STUDY OF IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R261X, R252W, R408W and I65T mutations in the phenylalanine hydroxylase gene in patients with phenylketonuria at northeast Brazil

Tatiana Amorim^{1,2,3}, Thessika Hialla Almeida Araújo², Taise Lima de Oliveira², Erlane Marques Ribeiro⁴, Maria Juliana Rodovalho-Doriqui⁵, Marta Maria Galvão de Sousa Magalhães⁶, Emerson Santana Santos⁷, Angelina Xavier Acosta⁸

¹APAE Salvador

²Laboratório Avançado de Saúde Pública – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – BA

³Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

⁴Hospital Infantil Albert Sabin – Fortaleza – CE

⁵APAE – São Luiz – MA

⁶Universidade Federal de Sergipe

⁷Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas

⁸Faculdade de Medicina da Bahia – Universidade Federal da Bahia

Correspondência para (Corresponding Author): Tatiana Amorim
e-mail:amorim.tatiana@uol.com.br

Resumo

A deficiência da phenilalanina-hidroxilase (PAH), defeito bioquímico encontrado na Fenilcetonúria (PKU), é um dos mais conhecidos erros inatos do metabolismo no mundo, por ter seu diagnóstico amplamente realizado através da triagem neonatal. O gene da PAH é altamente heterogêneo, e a frequência das mutações varia entre as populações. No intuito de determinar as mutações mais comuns na região nordeste do Brasil, minimizando os custos, 129 pacientes não aparentados, oriundos de seis estados desta região, foram investigados para as mutações IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R261X, R252W, I65T e R408W, previamente descritas em outros estudos brasileiros. Usando esta triagem, 64,3% dos genótipos foram identificados.

As mutações mais frequentes foram IVS10nt11g→a (21,3%), seguida pela V388M, I65T (15,8%) e R252W (14,6%). Menos frequentes foram R261Q (8,7%) e R408W (1,2%). R261X não foi encontrada. As frequências relativas variaram entre os estados estudados. R252W foi especialmente frequente no nordeste da Bahia. Para a maioria dos estados do nordeste brasileiro, o conjunto das mutações estudadas, excetuando-se a R261X, mostrou-se eficaz em identificar a maioria dos alelos mutantes entre os pacientes com PKU.

Palavras-chave: Fenilcetonúrias, genótipo, nordeste

Abstract

Phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency, biochemical defect found in phenylketonuria (PKU), is one of the best known inborn errors of metabolism in the world, once its diagnosis is largely achieved through neonatal screening. The PAH gene is highly heterogeneous, and frequency of mutations varies among populations. In order to determine the most common mutations in the northeast region of Brazil, minimizing the costs, 129 unrelated patients, from six states in this region, were investigated for mutations IVS10nt11g → a, V388M, R261Q, R261X, R252W, R408W and I65T, which were previously described in other Brazilian studies. Using this screening, 64.3% of genotypes were identified. The most frequent mutations were IVS10nt11g → a (21.3%), followed by V388M, I65T (15.8%) and R252W (14.6%). R261Q (8.7%) and R408W (1.2%) were less frequent. R261X was not found. The relative frequencies varied among the states studied. R252W was especially common in northeastern Bahia. For most states in northeastern Brazil, this group of studied mutations (except R261X), was effective in identifying the majority of mutant alleles among patients with PKU.

Key words: phenylketonuria, genotype, northeastern

Introdução

A Fenilcetonúria (PKU) é a desordem mais comum do metabolismo dos aminoácidos, herdada de forma autossômica recessiva, caracterizada na grande maioria dos casos pela deficiência total ou parcial da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), codificada por um gene localizado no cromossomo 12 (Scriver & Kaufman, 2001).

A triagem neonatal é o primeiro passo para o diagnóstico assintomático de PKU e consequente tratamento com dieta restrita em fenilalanina, o que proporciona a prevenção da deficiência mental. Atualmente, quase todos os países do mundo realizam triagem neonatal para PKU.

A frequência de PKU varia amplamente entre as populações – de 1:2.500 na Turquia, 1:4.500 na Irlanda, 1:16.000 na Suíça (DiLella *et al.*, 1986), a 1:50.000 nos afrodescendentes dos EUA (Hofman *et al.*, 1991). Sua incidência é estimada em 1:10.000 em caucasoides (Bickel *et al.*, 1981). Em Portugal, a incidência da doença está descrita como de 1 caso a cada 11.031 NV (Vilarinho *et al.*, 2006). No Brasil, desde 2001 o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) garante diagnóstico neonatal e tratamento gratuito para PKU em todos os estados da federação, havendo uma frequência estimada da doença de 1:15.839 nascidos-vivos (NV) (Monteiro *et al.*, 2006). A incidência varia amplamente entre os estados (Ramalho *et al.*, 2004; Bandalize *et al.*, 2004; Monteiro *et al.*, 2006). No nordeste do Brasil, dados oficiais de incidência encontram-se disponíveis apenas para a Bahia, com 1 caso a cada 22.000NV (Amorim *et al.*, 2005), e Sergipe, com um caso para cada 23.036NV (Ramalho *et al.*, 2004) . Estima-se uma incidência de 1:10.000 nascidos vivos na população eurodescendente e 1:16.500 em orientais (Scriver & Kaufman, 2001).

As mutações na PAH apresentam-se em grande variedade entre as populações, atribuída às características de povoamento de cada região (Hofman *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1993, 1999; Guldberg *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001; Zschocke *et al.*, 2003). No Brasil, estudos realizados nas regiões sul e sudeste mostram distribuições mutacionais diversas, embora em todos eles as mutações de origem ibérica prevaleçam (Acosta *et al.*, 2001; Santana-da-Silva *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2006). Não existem trabalhos prévios descrevendo o perfil mutacional da PKU no nordeste do Brasil.

O grande número de estudos sobre o tema, desde que o gene da PAH foi identificado (Woo *et al.*, 1983), permitiu o conhecimento de que a PKU é um distúrbio altamente heterogêneo, com mais de 550 mutações identificadas até o momento (www.pahdb.mcgill.ca); esta diversidade relaciona-se com a variabilidade e gravidade clínica da doença, importantes para a determinação e otimização do tratamento (Erlandsen *et al.*, 2004). Entretanto, os custos do estudo molecular de todo o gene podem ser elevados, especialmente em regiões com graves desigualdades sociais, como é o caso do nordeste do Brasil (IBGE, 2010).

A determinação de um painel de mutações mais frequentes em cada região do Brasil permitirá o estabelecimento de estratégias mais simples e igualmente eficazes de diagnóstico molecular, orientação genética e tratamento.

O objetivo deste estudo foi descrever a frequência de um grupo de mutações no gene da PAH em pacientes com diagnóstico de PKU, acompanhados pelos Serviços de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) em seis estados do Nordeste do Brasil (Bahia, Sergipe, Alagoas, Ceará, Maranhão e Piauí).

Pacientes e Métodos

A amostra estudada foi composta de 129 afetados pela PKU diagnosticados pelos programas estaduais de triagem neonatal e acompanhados nos SRTN. Selecionou-se apenas um afetado por família. Foram avaliados 81 propósitos da Bahia (que possui 98 núcleos familiares diagnosticados), sete pacientes de Sergipe (que possui 16 propósitos diagnosticados), dezesseis pacientes de Alagoas (com 17 propósitos diagnosticados), onze pacientes do Ceará (estado que tem 57 núcleos familiares diagnosticados), onze pacientes do Maranhão (com 23 famílias diagnosticadas) e três pacientes do Piauí (com quatorze núcleos familiares diagnosticados) (comunicação pessoal dos SRTN, dados não publicados).

Participaram do estudo aqueles pacientes cujos responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento livre e esclarecido. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz/Bahia.

Foram coletadas amostras de 5 a 10ml de sangue total com EDTA de cada paciente. DNA genômico foi extraído através de técnica de fenol-clorofórmio (Panasci *et al.*, 1977).

As amostras foram amplificadas por PCR (Reação em cadeia de Polimerase), utilizando técnica previamente descrita (Saiki *et al.*, 1988). Foram investigadas sete mutações mais frequentes em estudos brasileiros anteriores (Acosta *et al.*, 2001; Santana-da-Silva *et al.*, 2003): IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R261X, R252W, I65T e R408W, através de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). As endonucleases de restrição utilizadas para a investigação de cada mutação estão descritas na Tabela 1. Fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida e corados com nitrato de prata.

Tabela 1. *Primers* e endonucleases de restrição utilizados para identificação de mutações de ponto no gene da PAH

Mutações	Região	Endonuclease de restrição	<i>Primers</i> (5'- 3')
V388M	Éxon 11	BsaAI	5'TGAGAGAAGGGGCACAAATG3'D
IVS10nt11g-a		Ddel	5'GCCAACCACCCACAGATGAG3'R
R261Q	Éxon 7	HinfI	5'GGTGATGAGCTTTGAGTTTTCTTTC3'D
R261X		Dde	5'AGCAAATGAACCCAAACCTC3'R
R252W		AvaI	
I65T	Éxon 3	TaqI	5' TTAGTTCCTGTGACTGTCTC 3'D
			5' AACGAGAAGGTCTAGATTCG 3'R
R408W	Éxon 12	StyI	5'ATGCCACTGAGAACTCTCTT3'D 5'GATTACTGAGAAACCGAGTGGCCT3'R

Resultados

Entre os 129 indivíduos com diagnóstico bioquímico de PKU investigados, 83 (64,3%) tiveram os dois alelos genotipados através da metodologia empregada. Em 36 (27,9%) pacientes apenas um alelo foi identificado, e 10 (7,8%) ambos os alelos permaneceram sem mutações identificadas. Através da pesquisa das 7 mutações descritas, foi possível identificar 203/258 alelos, o que corresponde a 78,7% dos alelos de PKU da amostra.

Considerando-se a amostra total, a mutação mais frequentemente encontrada foi a IVS10nt11g→a (21,3% dos alelos), seguida pela V388M e I65T (ambas presentes em 15,8% dos alelos), e em seguida R252W, com 14,6% dos alelos. A mutação R261Q foi observada em 8,7% dos alelos e R408W, em apenas 1,2%. A mutação R261X não foi encontrada em nenhum dos 258 alelos estudados. Entretanto, ao analisarmos os estados individualmente, observamos que a distribuição das mutações é diversa, sendo a IVS10nt11g→a inexistente no Ceará, e a V388M, no Piauí.

Avaliando-se separadamente o estado da Bahia, que contribuiu com a maior parcela das amostras (162 alelos/63,8% do total de alelos estudados), observamos que as mutações IVS10nt11g→a, V388M, R252W e I65T respondem pela identificação de 74% dos alelos com mutação encontrada. A frequência das seis mutações encontradas, por estado, está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição relativa das mutações IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R252W, I65T e R408W no gene da PAH nos 129 pacientes com PKU de seis estados do nordeste do Brasil

Mutação	BAHIA n (%)	SERGIPE n (%)	ALAGOAS n (%)	CEARÁ n (%)	MARANHÃO n (%)	PIAUI n (%)	TOTAL n (%)
IVS10NT11g>a	36 (22,2)	5 (35,7)	5 (15,6)	0 (0)	9 (28,3)	3 (50)	56 (22,1)
V388M	33 (20,4)	0 (0)	5 (15,6)	2 (9,1)	1 (4,5)	0 (0)	40 (15,8)
R261Q	8 (4,9)	5 (35,7)	8 (25)	0 (0)	1 (4,5)	0 (0)	22 (8,7)
R252W	24 (14,8)	2 (14,3)	3 (9,4)	4 (18,2)	5 (22,7)	0 (0)	37 (14,6)
I65T	24 (14,8)	2 (14,3)	3 (9,4)	7 (31,8)	2 (9,1)	2 (33,3)	40 (15,8)
R408W	1 (0,6)	0 (0)	0 (0)	2 (9,1)	0 (0)	0 (0)	3 (1,2)
TOTAL	126 (77,7)	14 (100)	24 (75)	15 (68,2)	16 (72,7)	5 (83,3)	196 (75,9)

n = número de alelos com a mutação
% = percentual de mutação identificada

Entre os 83 pacientes que tiveram os dois alelos genotipados, 44 (53%) apresentaram genótipo homocigoto: V388M/V388M (9), R252W/R252W (11), IVS10/IVS10 (13), I65T/I65T (5), R261Q/R261Q (6). Foram observados 14 genótipos distintos. A frequência dos genótipos encontrados está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Genótipos de 83 pacientes com PKU no nordeste do Brasil, investigados para as mutações IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R261X, R252W, I65T e R408W no gene da PAH.

Genótipos	Frequências genotípicas (n)
IVS10/IVS10	15,85 (13)
R252W/R252W	13,25 (11)
V388M/V388M	10,98 (9)
IVS10/I65T	10,98 (9)
R261Q/R261Q	7,32 (6)
IVS10/V388M	7,32 (6)
V388M/ I65T	7,32 (6)
I65T/I65T	6,10 (5)
V388M/ R252W	4,88 (4)
IVS10/R252W	2,44 (2)
R252W/I65T	2,44 (2)
IVS10/R261Q	1,22 (1)
IVS10/R408W	1,22 (1)
V388M/ R261Q	1,22 (1)
R261Q/I65T	1,22 (1)
R261Q/R252W	1,22 (1)

Discussão

A PKU é uma doença com alta heterogeneidade molecular, tendo sido descritas até o momento mais de 550 mutações no gene da PAH (www.pahdb.mcgill.ca). Este trabalho propôs identificar as bases moleculares da PKU e das HPA dos pacientes acompanhados nos SRTN de seis estados da região nordeste do Brasil, pesquisando sete mutações (R252W, R261Q, R408W, I65T, IVS10nt11G→A, V388M e R261X), as quais encontram-se entre as mais frequentes no mundo, além de estarem presentes em trabalhos realizados em São Paulo (Acosta *et al.*, 2001), em Minas Gerais (Santos, *et al.*, 2006) e no Sul do Brasil (Santana-da-Silva *et al.*, 2003).

A imigração europeia para o Brasil iniciou-se no século XVI com a chegada das primeiras embarcações portuguesas na Bahia. Nos séculos seguintes, inúmeras embarcações europeias atracaram no Brasil, tendo o ápice da imigração se dado no século XIX. Povos da Espanha, Itália e Alemanha, entre outros países, vieram para o território brasileiro, estimulados por novas descobertas, principalmente na área econômica (Vicentino & Dorigo, 1997). Consequentemente, a formação da população brasileira deu-se de maneira heterogênea, apresentando contribuição dos europeus, africanos e ameríndios. A região nordeste do Brasil foi a primeira a ser colonizada, recebendo importante influxo de população portuguesa, especialmente no interior, uma vez que a posterior imigração forçada de escravos africanos distribuiu-se mais intensamente no litoral (Azevedo, 1987). No século 17, as invasões holandesas introduziram novo grupo populacional na Bahia e em Pernambuco (Almeida *et al.*, 2001). Em especial, a população da capital do estado da Bahia, Salvador, apresenta uma característica peculiar, já que se estima que aproximadamente 80% da população é constituída de indivíduos miscigenados, com ascendência africana e europeia, marcadamente portuguesa (Azevêdo *et al.*, 1982).

As mutações IVS10nt11g→a (presente em mais de 20% de todos os alelos estudados), V388M e I65T (superior a 15% cada), R252W (cerca de 15%) e R261Q (em torno de 8%), são frequentes na Itália (Giannattasio *et al.*, 2001) e na Península Ibérica - Portugal e Espanha (Desviat *et al.*, 1999 e Rivera *et al.*, 1998), embora com frequências menores, enquanto que a mutação R408W, encontrada em apenas três alelos da amostra, é mais comum na Alemanha (Zschocke, 2003) e, levando-se em conta vários trabalhos publicados até o momento, a de maior frequência no mundo (www.pahdb.mcgill.ca).

Neste estudo, as mutações V388M, IVS10nt11g→a, I65T e R252W foram responsáveis por aproximadamente 70% dos alelos identificados. Este resultado foi superior aos encontrados em estudos realizados em: São Paulo - taxa de detecção de 36,5% (Acosta *et al.*, 2001) e Minas Gerais - taxa de detecção de 45,1 % (Santos, *et al.*, 2006), demonstrando que há maior homogeneidade no nordeste, e que as mutações investigadas são mais frequentes nesta região do Brasil. Tal achado correlaciona-se possivelmente com a origem destas mutações (península ibérica e orla do mediterrâneo) e a origem populacional dos estados investigados.

Observando-se apenas as duas mutações mais frequentes, V388M e IVS10nt11g→a, percebeu-se que estas foram responsáveis por 37,6% dos alelos estudados (e por 47,8 dos alelos com mutação identificada pelo método) . Este resultado mostrou-se também superior aos encontrados em estudos realizados em São Paulo - taxa de detecção de 26,5% (Acosta *et al.*, 2001), em Minas Gerais - taxa de detecção de 34,4 % (Santos *et al.*, 2006) e no Sul do Brasil - taxa de detecção de 12,2% (Santana-da-Silva *et al.*, 2003). A IVS10nt11g→a é a mutação mais frequentemente encontrada em Portugal e em toda a orla mediterrânea, o que sugere fortemente um gradiente de migração de leste para oeste, antes mesmo das viagens transoceânicas (Vilarinho, 2006). As informações disponíveis sobre a mutação V388M parecem ligar sua origem à península ibérica (Leandro *et al.*, 1995). Entretanto, a maior frequência desta mutação (21%) foi descrita em Minas Gerais, sudeste do Brasil (Santos *et al.*, 2006). Este estado faz fronteira com a Bahia, e as similaridades entre as frequências mutacionais descritas podem sugerir históricos de colonização semelhantes entre os dois estados (Callegari-Jacques *et al.*, 2003). No nordeste do Brasil, todavia, a distribuição das seis mutações detectadas difere bastante entre os estados estudados, conforme demonstrado na Tabela 2. Na Bahia, estado que contribuiu com a maior parte da amostra (e, portanto, apresenta-se mais representativo), o estudo das mutações IVS10nt11g→a, V388M, I65T e R252W foi capaz de identificar mais de 70% dos alelos e mais da metade dos genótipos. Neste estado em particular, observou-se que a mutação R252W ocorreu majoritariamente no município de Monte Santo (nordeste do estado) e vizinhos, de onde são originários todos os casos de homozigose para R252W observados no estado. Esta região apresenta alta frequência de doenças monogênicas de herança autossômica recessiva, cujas causas encontram-se em investigação (Amorim *et al.*, 2007). A R252W, uma transição C/T no códon 252 do gene da PAH, confere atividade enzimática residual nula *in vitro*, e portanto se correlaciona com formas graves da doença, tem sido descrita em diversos estudos europeus, especialmente aqueles que avaliaram populações mediterrâneas (Guldborg *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). 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 neste estudo (Kalanin *et al.*, 1994). Assim como na população de Monte Santo, pode-se sugerir efeito fundador, associado à consanguinidade, como origem deste achado.

Já em Sergipe, IVS10nt11g→a, R261Q, R25W e I65T formaram um conjunto capaz de genotipar toda a amostra. A mutação V388M não foi encontrada nos 14 alelos estudados. Entretanto, esta amostra corresponde a 43,8% dos pacientes diagnosticados no estado, e diferenças podem surgir quando a investigação for ampliada.

No estado de Alagoas, as mutações IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R252W e I65T apresentaram frequências individuais acima de 10%, e juntas foram capazes de identificar 82% dos alelos. A amostra de Alagoas compreendeu a quase totalidade dos pacientes em acompanhamento no estado, e pode, portanto, ser considerada representativa, e as mutações citadas compor um painel adequado para triagem mutacional.

O Ceará, estado que possui 57 propósitos diagnosticados, contribuiu com 19,3% destes para a amostra em estudo. Considerando-se como critério a frequência superior a 10%, o melhor conjunto, capaz de identificar 50% dos alelos, incluiu as mutações R252W e I65T. IVS10nt11g→a, a mutação mais comum na amostra geral e em cada estado (com exceção de Alagoas), não esteve presente entre os pacientes do Ceará. Entretanto, é possível que tal perfil sofra influência das limitações impostas pelo tamanho amostral, não sendo recomendada a generalização.

No estado do Maranhão, IVS10nt11g→a e R252W responderam por 50% dos alelos estudados. V388M, I65T e R261Q apresentaram-se com frequências abaixo de 10%. O pequeno tamanho amostral (56,5% dos 23 pacientes diagnosticados no estado) também pode ter interferido neste resultado, e amostras mais representativas poderão fornecer um painel de mutações mais amplo, e possivelmente semelhante ao da Bahia, como candidato a triagem mutacional para PKU neste estado.

Por fim, no estado do Piauí, com apenas três indivíduos investigados, somente IVS10 nt11g-a e I65T foram encontradas, respondendo por 66,8% dos alelos estudados.

Deste modo, observa-se que, mesmo entre estados de uma mesma região geográfica, a distribuição mutacional pode apresentar-se diversificada. Estes achados corroboram os dados históricos de colonização do país, que ressaltam significativas diferenças nos processos de ocupação do território brasileiro (Callegari-Jacques *et al.*, 2003).

Conclusão

Os resultados encontrados demonstram que o conjunto de mutações analisadas, com exceção da R261X (não encontrada) e R408W (encontrada em uma frequência global inferior a 1,5%), pode constituir uma boa opção para a análise inicial do gene da PAH em pacientes com PKU e HPA no nordeste do Brasil. Entretanto, diferentes painéis podem ser ideais para cada estado em particular. Vale ressaltar que o fato de que quatro (Sergipe, Ceará, Maranhão e Piauí) dos seis estados avaliados contribuíram com amostras pequenas, pouco representativas da população de indivíduos com PKU, dificulta a indicação mais criteriosa de um painel de mutações a ser investigado, reforçando a importância de expandir este tipo de estudo na região. A elevada frequência de pacientes com mutações em homozigose (mais de 50% dos que tiveram os dois alelos genotipados) provavelmente é resultado dos altos níveis de consanguinidade nas populações do nordeste do Brasil, fato este justificado por questões culturais (Azevêdo *et al.*, 1986; Freire-Maia *et al.*, 1989; Freire-Maia *et al.*, 1990; Amorim *et al.*, 2005).

A mutação 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 IVS10nt11g→a, V388M, R261Q e I65T) corroboram com os fatos históricos da colonização, evidenciando a grande influência desses países na formação populacional brasileira, em especial nordestina, onde o influxo de outros imigrantes europeus não ibéricos foi menos significativo do que em outras regiões do país.

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

Referências Bibliográficas

- Acosta, AX; Silva, WA; Carvalho, TM; Gomes, M; Zago, MA. Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Gene in Brazilian Patients with Phenylketonuria. **Human Mutation**. 17:122-130, 2001.
- Almeida, A. A invasão Holandesa. In: 500 anos do povo brasileiro – uma visão crítica. **Editora Paz e Terra**, p. 175-231. 2001.
- Amorim T, Abé-Sandes K, Castilla E, Grossi G, Vieira T, Queiroz I, Purificação A, Orioli I, Acosta AX. 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, 195, 2007.
- Amorim T, Gatto SPP, Boa-Sorte N, Leite MEQ, Fontes MIMM, Barretto, J *et al.*. Aspectos Clínicos da Fenilcetonúria em serviço de referência em triagem neonatal da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil, Recife**, 5 (4): 457-462, out./dez., 2005.
- Azevêdo ES, Chautard-Freire-Maia EA, Freire-Maia N, Fortuna CMM, Sandes KA, Santos, MG *et al.* Mating types in a mixed and multicultural population of Salvador, Brazil. **Rev. bras. Genética**; 9(3): 487-96, sept. 1986.
- Azevêdo ES. Populações da Bahia: Genética e História. **Universitas**, (29):3-14, jan./abr.1982.
- Azevêdo, ES. Forças econômicas e estrutura genética de populações nordestinas. **Interciência** 12:233-8, 1987.
- Bickel H, Bachmann C, Beckers R. Neonatal mass screening for metabolic disorders. **Eur. J. Pediatr**. 137:133- 139,1981.
- Brandalize SRC, Czeresnia D. Evaluation of the program for prevention and health promotion in phenylketonuria patients in Brazil. **Rev Saúde Pública**; 38(2):1-6. 2004.
- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME *et al.* Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population. **American Journal Of Human Biology** 15:824–834, 2003.
- Pérez B, Gámez A, Sánchez A, García MJ, Martínez-Pardo M *et al.* Genetic and phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in Spain: molecular survey by regions. **Eur J Hum Genet**. Apr;7(3):386-92,1999.
- DiLella AG, Kwok SCM, Ledley FD, Marvit J., Woo SLC. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. **Biochemistry**, , 25 (4), p. 743–749,1986.
- Erlandsen H, Pey AL, Gámez A, Pérez B, Desviat LR, Aguado C *et al.* Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. **PNAS** . 101 (48), p.16903–16908 Nov. 30, 2004.

Freire-Maia N. Casamentos consanguíneos no Brasil. **Rev Bras Biol**; 50(4): 863-6, nov. 1990.

Freire-Maia N. Pequena história dos estudos sobre uniões consanguíneas, com exemplos de populações brasileiras. **Ciênc. cult.** (São Paulo); 41(5): 483-9, maio 1989.

Giannattasio S, Dianzani I, Lattanzio P, Spada M, Romano V, Cali F *et al.* Genetic Heterogeneity in Five Italian Regions: Analysis of PAH Mutations and Minihaplotypes. **Hum Hered** . 52:154–159.,2001.

Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, François B, Michiels L, *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(1),p. 71-79, July 1998.

Hofman KJ, Steel G, Kazazian HH, Valle D. Phenylketonuria in U.S. lacks: molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. **Am J Hum Genet.** 48(4): 791–798. April, 1991.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e estatística) Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. (accessed on 29 Aug 2010).

Kalanin J, Takarada Y, Kawaga S, Yamashita K, Ohtsuka N and Matsuoka A. Gypsy Phenylketonuria: A Point Mutation of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in Gypsy Families From Slovakia. **American Journal of Medical Genetics.** 49:235-239, 1994.

Leandro P, Rivera I, Lechner MC, Tavares de Almeida I and Konecki The V388M Mutation Results in a Kinetic Variant Form of Phenylalanine Hydroxylase. **Molecular Genetics and Metabolism**, 69(3): 204-212, March, 2000.

Monteiro LTB, Cândido LMB. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. **Ver. Nutr.**, Campinas, 19(3):381-387, maio/jun.,2006.

Panasci LC, Green DC, Fox PA, Schein PS. A phenol technique for extraction of alkylated DNA, RNA and protein from a single tissue sample. **Anal Biochem** 83(2):677-88, 1977.

Perez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in the Spanish Population: Mutation Profile and Association with intragenic Polymorphic Markers. **American Journal of Human Genetics.** 60:95-102, 1997.

Ramalho RJR, Ramalho ARO, Oliveira CRP, Aguiar-Oliveira MH. Evolução do Programa de Triagem Neonatal para o Hipotireoidismo Congênito e Fenilcetonúria no Estado de Sergipe de 1995 a 2003. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**48 (6): 890-6, 2004.

Rivera I , Leandro,P, Lichter-Konecki U ,Tavares de Almeida I , Lechner MC. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. **J. Med Genet.** 35:301-304,1998.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT *et al.* Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science** 239, 487,1988.

Santana-da-Silva LC, Carvalho TS, Silva FB, Morari L, Fachel AA, Pires R, *et al.* Molecular Characterization of phenylketonuria in South Brazil. **Molecular Genetics and Metabolism**. v.79), p. 17-24, 2003.

Santos LL, Magalhães MC, Reis AO, Starling ALP, Januário JN, Fonseca CG, *et al.* Frequencies of phenilalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, Y414C, and IVS12nt1 in Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Research**. 5 (1):16-23, 2006.

Scriver, CR, Kaufman, S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill. pp 1667–1724, 2001.

Vicentino C e Dorigo G. **História do Brasil**. São Paulo, Scipione, 1997.

Vilarinho L, Queirós A, Leandro P, Almeida IT, Rivera I. Fenilcetonúria Revisitada. **Arquivos de Medicina**, 20(5-6):161-72, 2006.

Woo SL, Lindsy AS, Guttler F, Chandra T, Robson KJ. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. **Nature**. 306 (5939):151-5, 1983.

Yang Y, Drummond-Borg M. Molecular analysis of phenylketonuria (PKU) in newborns from Texas. **Human Mutation**. v.17(6), p. 523, June 2001.

Zschocke, J. Phenylketonuria Mutations in Europe. **Human Mutation** 21:345-356 2003.

ARTIGO 4 - ESTUDO DE CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO EM INDIVÍDUOS COM HIPERFENILALANINEMIA DO NORDESTE DO BRASIL

Study of genotype-phenotype correlation in individuals with hyperphenylalaninemia in northeastern Brazil

Amorim T, Rego FFA, Machado TMB, Araújo THA, Oliveira TL, Acosta AX.

- Este artigo corresponde ao proposto no Objetivo Geral no 1 - Definir as bases moleculares responsáveis pela HPA em indivíduos procedentes dos estados da região nordeste do Brasil; e nos Objetivos Específicos 1 - Detectar mutações no gene da PAH em indivíduos com diagnóstico de HPA e 4 - Estabelecer estudos de correlação genótipo-fenótipo.
- Situação do artigo – em atualização com estudos adicionais para posterior publicação.

ESTUDO DE CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO EM INDIVÍDUOS COM HIPERFENILALANINEMIA DO NORDESTE DO BRASIL

Study of genotype-phenotype correlation in individuals with hyperphenylalaninemia in northeastern Brazil

Amorim T^{1,2,3}, Rego FFA^{1,3}, Machado TMB^{1,4}, Araújo THA¹, Oliveira TL¹, Acosta AX⁵.

¹ Laboratório Avançado de Saúde Pública – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – BA

² APAE Salvador

³ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

⁴ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia

⁵ Faculdade de Medicina da Bahia – Universidade Federal da Bahia

Correspondência para (Corresponding Author): Tatiana Amorim
e-mail: amorim.tatiana@uol.com.br

RESUMO

A Fenilcetonúria (PKU) e outras Hiperfenilalaninemias (HPA) estão entre os erros inatos do metabolismo mais diagnosticados em todo o mundo, através dos programas de triagem neonatal. As mutações no gene da fenilalanina-hidroxilase (PAH) exibem ampla variabilidade, com diferentes efeitos no metabolismo da fenilalanina (Phe), a depender da atividade residual da PAH. Tal expressividade variável pode traduzir-se em diferentes condutas terapêuticas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o grau de predição do fenótipo bioquímico da PKU e HPA, a partir do genótipo. Foram avaliados 89 pacientes procedentes da região nordeste do Brasil, genotipados através de RFLP e sequenciamento gênico, utilizando o sistema de predição do fenótipo proposto por Guldberg e colaboradores. Foram identificados 32 diferentes genótipos. Correlação entre o fenótipo previsto pelo genótipo e o fenótipo observado através dos níveis de Phe ao diagnóstico apresentou-se adequada em 42,7% dos casos. A correlação foi mais evidente entre os pacientes com PKU leve ou moderada (68,2%) e genótipo homocigoto (45,4%). Mutações responsivas ao tratamento com BH4 (V388M e I65T) foram encontradas com frequência relevante (19,04% e 7,74%). Os resultados mostram correlação parcial entre o fenótipo e o genótipo, sendo necessário avaliar outros aspectos que possam influenciar na decisão terapêutica.

Palavras-chave: Fenilcetonúria, triagem neonatal, genótipo, fenótipo.

ABSTRACT

Phenylketonuria (PKU) and other hyperphenylalaninemias (HPA) are the most diagnosed inborn errors of metabolism worldwide, through neonatal screening programs. Mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene exhibit wide variability, with different effects on phenylalanine (Phe) metabolism, depending on the residual activity of PAH. This variable expression may result in different therapeutic approaches. This study aimed to evaluate the degree of prediction of the biochemical phenotype of PKU and HPA, from the genotype. We studied 89 patients from northeast Brazil, genotyped by RFLP and gene sequencing, using the phenotypic prediction system proposed by Guldberg et al. We identified 31 different genotypes. Correlation between phenotype provided by genotype and observed phenotype (defined by Phe levels at diagnosis) showed to be adequate in 42,7% of cases. The correlation was most evident among patients with mild or moderate PKU (68,2%) and homozygous genotype (45.4%). Mutations responsive to treatment with BH4 (I65T and V388M) were found with significant frequency (19.04% and 7.74%). The results show partial correlation between phenotype and genotype, and the need to evaluate other aspects that may influence the therapeutic decision.

Keywords: Phenylketonuria, newborn screening, genotype, phenotype.

INTRODUÇÃO

As hiperfenilalaninemias (HPA), entre elas a fenilcetonúria (PKU), estão entre os distúrbios metabólicos mais pesquisados em todo o mundo, uma vez que fazem parte do programa de triagem neonatal na maioria dos países (Botkin *et al*, 2005). No Brasil, em 2001, o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) foi criado, credenciando Serviços de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) em todos os estados do país, com o objetivo de estender a investigação para a totalidade das crianças nascidas (Carvalho *et al.*, 2007). As HPA são condições autossômicas recessivas, cuja etiologia principal consiste em mutações no gene que codifica a enzima hepática fenilalanina-hidroxilase (PAH) (Güttler *et al.*, 1990), responsável pela hidroxilação da fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr).

Uma vez identificadas, as HPA são classificadas em categorias bioquímicas, de acordo com os níveis sanguíneos de Phe sérica ao diagnóstico: PKU clássica (níveis de Phe acima de 20mg/dL), PKU moderada (Phe acima de 15mg/dL), PKU leve (Phe > 10mg/dL) e HPA não PKU (Phe > 3,5mg/dL), embora a maioria dos serviços agrupem as duas categorias intermediárias (leve e moderada) em um só grupo, denominado PKU leve. Esta variabilidade pode, em parte, ser explicada pela grande heterogeneidade apresentada pelo gene da PAH (Kayaalp *et al.*, 1997), com mais de 550 mutações descritas até o momento (Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase, 2010). 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 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 Tyr (Fiege & Blau, 2007; Zurflüh *et al.*, 2008).

Em diversos estudos, a presença de mutações em heterozigose composta no gene da PAH é elevada (Hofman *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1997, Guldberg *et al.*, 1998; Vilarinho *et al.*, 2006). Tal peculiaridade pode dificultar a previsão do fenótipo bioquímico a partir do genótipo, uma vez que frequentemente as duas mutações conferem atividades enzimáticas residuais distintas. Um sistema universal de predição do fenótipo das HPA a partir do genótipo foi proposto por Guldberg e colaboradores, em 1998, tendo sido amplamente utilizado (Mallolas *et al.*, 1999; Acosta, *et al.*, 2001; Kasnauskienė *et al.*, 2003; Zurflüh *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a correlação entre o genótipo encontrado, o fenótipo previsto e o observado em pacientes no nordeste brasileiro, região mais pobre do país, composta de nove estados, onde inexitem trabalhos prévios sobre as bases moleculares das HPA.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra foi composta de cem pacientes, oriundos de seis estados (Bahia, Sergipe, Alagoas, Ceará, Maranhão e Piauí) e acompanhados nos respectivos SRTN. Em 92 casos, dados sobre os níveis de Phe ao diagnóstico estavam

disponíveis, permitindo a classificação do fenótipo bioquímico (PKU clássica, PKU moderada, PKU leve ou HPA não PKU).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz – Bahia. Todos os responsáveis legais autorizaram a participação no estudo mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

A análise de mutações foi realizada por metodologia de PCR seguido de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou diretamente através de sequenciamento gênico, a partir de amostras de DNA extraídas de sangue total pela técnica de fenol-clorofórmio (Panasci *et al.*, 1977, Saiki *et al.*, 1988).

As atividades enzimáticas residuais previstas para cada mutação estão previamente descritas (Guldberg *et al.*, 1997), exceto para L249F e R270K. Deste modo, os genótipos que incluíam estas duas mutações foram excluídos da análise, que constou então de 89 indivíduos, cujos dados (genótipo, fenótipo previsto e fenótipo observado) estavam disponíveis.

Valores arbitrários (VA) foram atribuídos a cada mutação, e a soma dos VA em cada genótipo definiu o fenótipo previsto (Guldberg *et al.*, 1997). Os VA utilizados encontram-se descritos na Tabela 1.

Os dados foram inseridos em banco de dados utilizando o programa SPSS® versão 11.0. A análise incluiu medidas de frequências absolutas e relativas.

Tabela 1. Sistema de predição de fenótipo baseado no genótipo

Efeito fenotípico quando o VA da primeira mutação é				
VA da segunda mutação	1 (PKU clássica)	2 (PKU moderada)	4 (PKU leve)	8 (HPA não PKU)
1 (PKU clássica)	2 (PKU clássica)	3 (PKU moderada)	5 (PKU leve)	9 (HPA não PKU)
2 (PKU moderada)		4 (PKU moderada/leve)	6 (PKU leve)	10 (HPA não PKU)
4 (PKU leve)			8 (PKU leve/HPA não PKU)	12 (HPA não PKU)
8 (HPA não PKU)				16 (HPA não PKU)

Adaptado de: 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. *Am. J. Hum. Genet.* 63:71–79, 1998.

RESULTADOS

Foram encontradas 12 mutações (IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R252W, I65T, R408W, E390G, R241C, R158Q, L249F, R176L, D84Y), definindo 32 genótipos distintos (Tabela 2); a 28 destes foi possível atribuir um fenótipo previsto.

Tabela 2 – Genótipos encontrados em 100 indivíduos com HPA do nordeste do Brasil.

Genótipo	N (%)
IVS10-11G→A/IVS10-11G→A	13
R252W/R252W	11
IVS10-11G→A/I65T	9
V388M/V388M	9
IVS10-11G→A/V388M	6
R261Q/R261Q	6
V388M/I65T	6
I65T/I65T	5
R252W/I65T	5
V388M/R252W	3
I65T/E390G	2
IVS10-11G→A/R252W	2
R252W/E390G	2
R252W /R261Q	2
V388M/R261Q	2
I65T/R241C	1
IVS10/D84Y	1
IVS10-11G→A/E390G	1
IVS10-11G→A/R176L	1
IVS10-11G→A/R241C	1
IVS10-11G→A/R261Q	1
IVS10-11G→A/R408W	1
L249F/L249F	1
R176L/D84Y	1
R252W/R408W	1
R261Q/E390G	1
R261Q/I65T	1
R261Q/R158Q	1
R408W/L249F	1
V388M/E390G	1
V388M/L249F	1
V388M/R176L	1
Total	100

Vinte e sete indivíduos apresentaram duas mutações com atividade residual nula, 32 apresentaram-se com uma mutação nula e outra com atividade residual

(hemizigotos funcionais) e em 30 pacientes ambas as mutações encontradas conferiam alguma atividade enzimática residual.

As informações relativas aos fenótipos previstos a partir do genótipo e observados (níveis de Phe ao diagnóstico) encontram-se expostas na Tabela 3. Para efeitos de análise, os indivíduos com fenótipos de PKU Leve e moderadas foram agrupados em uma só categoria, devido à dificuldade em estabelecer uma distinção objetiva entre estes fenótipos.

Tabela 3 – Fenótipo previsto e fenótipo observado em 89 pacientes com HPA no nordeste do Brasil

Identificação	Genótipo	Fenótipo previsto	Fenótipo observado
AL 001A	V388M/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
AL 002A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
AL 004A	R261Q/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
AL 004A	R261Q/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
AL 005A	R261Q/R252W	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
AL 010A	IVS10/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
AL 013A	IVS10/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
AL 014A	R261Q/R261Q	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
AL 016A	V388M/R261Q	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 001A	V388M/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 002A	IVS10/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 003A	R252W/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 004A	R252W/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 005A	R252W/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 006A	R176L/D84Y	HPA NÃO PKU	HPA NÃO PKU
BA 007A	IVS10/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 009A	V388M/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 010A	IVS10/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 012A	V388M/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 013A	V388M/I65T	PKU MODERADA/LEVE	HPA NÃO PKU
BA 015A	IVS10/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 016A	IVS10/R408W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 017A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 018A	V388M/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 019A	V388M/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 020A	IVS10/R261Q	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 021A	V388M/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 022A	R261Q/E390G	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 026A	R252W/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 031A	V388M/R261Q	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 032A	IVS10/D84Y	PKU CLÁSSICA	PKU MODERADA/LEVE
BA 033A	I65T/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 034A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 035A	IVS10/R241C	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 036A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 037A	R252W/E390G	PKU MODERADA/LEVE	HPA NÃO PKU
BA 038A	I65T/R241C	PKU MODERADA/LEVE	HPA NÃO PKU
BA 039A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA

BA 040A	R252W/E390G	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 042A	IVS10/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 043A	I65T/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 044A	IVS10/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 045A	R252W/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 046A	I65T/E390G	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 047A	R252W/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 048A	IVS10/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 049A	V388M/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 050A	IVS10/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 051A	V388M/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 052A	R252W/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 053A	V388M/E390G	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 054A	I65T/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 057A	R261Q/R261Q	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 058A	IVS10/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 059A	V388M/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 060A	V388M/R176L	HPA NÃO PKU	HPA NÃO PKU
BA 061A	IVS10/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 062A	R252W/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 063A	IVS10/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 064A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 067A	R252W/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU MODERADA/LEVE
BA 068A	I65T/E390G	PKU MODERADA/LEVE	PKU MODERADA/LEVE
BA 069A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 070A	IVS10/E390G	PKU MODERADA/LEVE	HPA NÃO PKU
BA 071A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 072A	R261Q/R261Q	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 074A	V388M/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 075A	V388M/R252W	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 076A	I65T/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 077A	V388M/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
BA 079A	V388M/R252W	PKU MODERADA/LEVE	HPA NÃO PKU
BA 080A	R252W/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
BA 081A	R252W/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU MODERADA/LEVE
CE 001A	V388M/V388M	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
CE 006A	R252W/R408W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
CE 008A	R252W/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
CE 010A	R252W/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
MA 006A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU MODERADA/LEVE
MA 007A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU MODERADA/LEVE
MA 008A	R252W/R252W	PKU CLÁSSICA	PKU MODERADA/LEVE
MA 009A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
MA 011A	V388M/R252W	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
SE 001A	R261Q/R261Q	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
SE 002A	R261Q/R252W	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
SE 003A	IVS10/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
SE 004A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU CLÁSSICA
SE 005A	IVS10/IVS10	PKU CLÁSSICA	PKU MODERADA/LEVE
SE 006A	R261Q/R261Q	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA
SE 007A	R252W/I65T	PKU MODERADA/LEVE	PKU CLÁSSICA

AL – Alagoas; BA- Bahia; CE – Ceará; MA – Maranhão; SE – Sergipe.

Foi observado mais de um fenótipo bioquímico para alguns genótipos. O genótipo R252W/R252W, composto por mutação nula em homozigose e, portanto, preditor de fenótipo de PKU clássica, se associou em três casos à PKU moderada ou leve.

Entre os casos em que o genótipo previu a PKU clássica (28), apenas sete exibiram fenótipo bioquímico discordante. Já entre os sete casos com fenótipo bioquímico observado de HPA não PKU, em apenas dois houve previsão desta categoria (nos outros 5 casos o genótipo previu PKU leve ou moderada).

Em 42,7% (38/89) dos indivíduos, houve correlação entre o fenótipo previsto e o observado, sendo esta correlação positiva mais importante entre os casos de PKU leve ou moderada (68,2%). Esta correlação foi mais frequente entre os genótipos homozigotos (45,24%) do que entre os heterozigotos compostos (22,6%). A correlação mais desigual se deu para os casos de HPA não PKU: em apenas 28,6% (2/7) dos pacientes que apresentavam este fenótipo, ele foi previsto corretamente. Os percentuais de correlação entre o fenótipo previsto e o observado encontram-se descritos nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Correlação entre fenótipo previsto e fenótipo observado em 89 pacientes com HPA do nordeste do Brasil

Fenótipo Observado				
Fenótipo Previsto	CLÁSSICA	MOD-LEVE	HPA NÃO PKU	Total
CLÁSSICA N (%)	21 (35%)	7 (31,8%)	0	28 (31,5%)
MOD-LEVE N (%)	39 (65%)	15 (68,2%)	5 (71,4%)	59 (66,3%)
HPA NÃO PKU N (%)	0	0	2 (28,6%)	2 (2,2%)
Total (%)	60 (65,9%)	22 (26,1%)	7 (8,0%)	89 (100,0%)

Índice Kappa = 0,079 (Concordância pobre)

Tabela 5 – Percentual de correlação entre fenótipo previsto e observado entre os 28 genótipos analisados

Genótipo	N	Frequência (%)	Nº fenótipos observados	Índice de correlação genótipo/fenótipo (%)
IVS10/IVS10	13	14,77	2	76,9
R252W/R252W	10	11,36	2	70
V388M/V388M	9	10,23	1	0 (100% clássica)
IVS10/I65T	7	7,95	2	14,3
IVS10/V388M	5	5,68	2	20 (80% clássica)
R252W/I65T	5	5,68	2	40 (60% clássica)
R261Q/R261Q	5	5,68	2	40 (60% clássica)
V388M/I65T	5	5,68	3	20 (60% clássica)
I65T/I65T	4	4,55	1	0
V388M/R252W	3	3,41	2	0 (66% clássica, 33% HPA)
I65T/E390G	2	2,27	1	100
IVS10/R252W	2	2,27	1	100
R252W/E390G	2	2,27	2	50
R261Q/R252W	2	2,27	2	50
I65T/R241C	1	1,14	1	0
IVS10/D84Y	1	1,14	1	0
IVS10/E390G	1	1,14	1	0
IVS10/R176L	1	1,14	1	0
IVS10/R241C	1	1,14	1	100
IVS10/R261Q	1	1,14	1	100
IVS10/R408W	1	1,14	1	100
R176L/D84Y	1	1,14	1	100
R252W/R408W	1	1,14	1	100
R261Q/E390G	1	1,14	1	100
R261Q/I65T	1	1,14	1	0
V388M/E390G	1	1,14	1	100
V388M/R176L	1	1,14	1	100
V388M/R261Q	1	1,14	1	0

DISCUSSÃO

As doze mutações encontradas neste grupo de pacientes apresentaram-se em 32 genótipos diferentes, reforçando o conhecimento sobre a heterogeneidade do locus da PAH (Güttler *et al.*, 1990). Entre estes, 28 permitiram previsão do fenótipo a partir do genótipo.

Os maiores índices de correlação ocorreram entre os pacientes com PKU leve ou moderada, onde mais da metade dos fenótipos observados foram corretamente previstos, e homocigotos (IVS10-11G>A/IVS10-11G>A, R252W/R252W, R261Q/R261Q, com 45,4% de correlação adequada). Entre os heterocigotos compostos, nove genótipos apresentaram correlação adequada entre o fenótipo previsto e o observado (I65T/E390G, IVS10-11G→A/R241C, IVS10-11G→A/R252W,

IVS10-11G→A/R261Q, IVS10-11G→A/R408W, R252W/E390G, R252W/R408W, R261Q/E390G, V388M/E390G). Todas as mutações encontradas nos casos em que o genótipo foi capaz de prever acertadamente o fenótipo eram do tipo *missense*, com exceção da IVS10-11G→A, uma mutação que afeta o sítio de *splice* entre o íntron 10 e o éxon 11. Virtualmente todas as mutações encontradas apresentaram inconsistências com o fenótipo observado em alguns casos. A distorção mais evidente ocorreu em um caso de genótipo V388M/R252W, onde o fenótipo previsto seria de PKU leve ou moderada, e o observado foi HPA não PKU. Afora esta exceção, em nenhum caso houve discrepância de mais de uma categoria. Em alguns casos, o mesmo genótipo correlacionou-se com mais de um fenótipo metabólico, o que também já foi descrito em estudos anteriores (Mallolas *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2010).

Vários trabalhos têm postulado que o genótipo não é capaz de prever adequadamente o fenótipo bioquímico nas HPA, e que outros fatores, como absorção intestinal, taxa de depuração hepática, e influência de outros genes, podem estar envolvidos no processo (Kayaalp *et al.*, 1997; Scriver *et al.*, 2001, Santos *et al.*, 2010). No presente trabalho, os genótipos encontrados foram capazes de prever adequadamente o fenótipo em apenas 42,7% dos casos. As inconsistências observadas aconteceram principalmente entre os pacientes com HPA não PKU. Entretanto, este grupo foi pequeno, e uma vez que os níveis de Phe habitualmente flutuam ao longo do tempo, isto pode ter prejudicado a consistência dos dados.

O fato de que os maiores índices de correlação genótipo-fenótipo ocorreram entre os pacientes com PKU leve ou moderada reveste-se de especial importância, uma vez que neste grupo de pacientes observa-se a maior frequência de responsividade ao tratamento com o cofator da PAH, a tetrahydrobiopterina (BH4) (Blau *et al.*, 2003; Desviat *et al.*, 2004; Blau & Erlandesen, 2004; Fiege & Blau, 2007; Trefz *et al.*, 2008; Zurflüh *et al.*, 2008). Em especial, as mutações I65T e V388M (presentes no domínio catalítico da enzima), bem relacionadas à responsividade ao BH4 (Trefz *et al.*, 2008), foram encontradas em altas frequências neste grupo de pacientes (7,74% e 19,04% dos alelos, respectivamente dados não apresentados). Deste modo, as características moleculares destes pacientes poderão ser de utilidade para a otimização do tratamento.

CONCLUSÕES

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 escolham 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 AX; Silva, WA; Carvalho, TM; Gomes M; Zago, MA. Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Gene in Brazilian Patients with Phenylketonuria. **Human Mutation** 17:122-130 (2001).

Blau N, Bernegger C, Trefz FK. Tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia due to homozygous mutations in the phenylalanine hydroxylase gene. **Eur J Pediatr** (2003) 162:196.

Blau N and Erlandsen H. The metabolic and molecular basis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism** 82(2004) 101-111.

Botkin JR. Research for Newborn Screening: Developing a National Framework. **Pediatrics** 2005;116;862-871.

Carvalho TM, Pimentel-dos-Santos H, Santos ICGP, Vargas P, Pedrosa J. Newborn Screening: A national public health programme in Brazil. **J Inherited Metab Dis** (2007) 30:615.

Desviat LR, Pérez B, Bèlanger-Quintana A, Castro M, Aguado C, Sánchez A *et al.* Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype. **Molecular Genetics and Metabolism** 83 (2004) 157-162.

Fiege B and Blau N. Assessment of tetrahydropterin (BH4) Responsiveness in Phenylketonuria. **The Journal of Pediatrics**, June, 2007, 627-630).

Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, François B, Michiels L, Ullrich K, Hoffmann GF, Burgard P, Schmidt H, Meli C, Riva E, Dianzani I, Ponzzone A, Rey J and Güttler F. A European Multicenter Study of Phenylalanine Hydroxylase Deficiency: Classification of 105 Mutations and a General System for Genotype-Based Prediction of Metabolic Phenotype. **Am. J. Hum. Genet.** 63:71–79, 1998.

Güttler F, Lou H. Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. In: Fernandes J, Saudubray JM, Tada K, (eds). Inborn metabolic diseases: diagnostic and treatment. **Springer-Verlag**, 1990, pp161-174.

Hofman K J, Steel G, Kazazian H H, Valle D. Phenylketonuria in U.S. lacks: molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. *Am J Hum Genet.* 1991 April; 48(4): 791–798.

Kasnauskienė J, Cimbalistienė L, Kučinskas V. Validation of *PAH* genotype-based predictions of metabolic phenylalanine hydroxylase deficiency phenotype: investigation of PKU/MHP patients from Lithuania. *Med Sci Monit*, 2003; 9(2): CR142-146.

Kayaaalp E, Treacy E, Waters P, Byck S, Nowacki P, Scriver C. Human Phenylalanine Hydroxylase Mutations And Hyperphenylalaninemia Phenotypes: A Metaanalysis of Genotype-Phenotype Correlations. *Am. J. Hum. Genet.* 61:1309-1317, 1997.

Mallolas J, Vilaseca MA, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Estivill X, Milà M. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the population resident in Catalonia: genotype-phenotype correlation. *Hum genetics* (1999)105:468-473.

Okano Y, Eisensmith RC, Güttler F, Lichter-Konecki U, Konecki DS, Trefz FK, Dasovich M, Wang T, M.S., Henriksen K, Lou H, and Woo S. Molecular Basis of Phenotypic Heterogeneity in Phenylketonuria. *N Engl J Med* 1991; 324:1232-1238, May 2, 1991.

Panasci LC, Green DC, Fox PA, Schein PS. A phenol technique for extraction of alkylated DNA, RNA and protein from a single tissue sample. *Anal Biochem* 83(2):677-88, 1977.

Perez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in the Spanish Population: Mutation Profile and Association with intragenic Polymorphic Markers. *American Journal of Human Genetics.* 60:95-102, 1997.

Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase (2010). <http://www.pahdb.mcgill.ca/>.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT *et al.* Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239, 487, 1988.

Santos LL, Fonseca CG, Starling, ALP, Januário NJ, Aguiar MJB, Peixoto MGCD and Carvalho MRS. Variations in genotype-phenotype correlations in phenylketonuria patients. *Genetics and Molecular Research* 9 (1):1-8 (2010).

Scriver CR, Kaufman S. 2001. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** New York: McGraw-Hill. pp 1667–1724.

Trefz FK, Scheible D, Götz H, Frauendienst-Egger G. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *J Inherit Metab dis.* Volume 32, Number 1, 22-26 (2008).

Vilarinho L, Queirós A, Leandro P, Almeida, IT, Rivera I. Fenilcetonúria Revisitada. **Arquivos de Medicina**, 20(5-6):161-72 (2006).

Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet, F, Chery C, Burlina A, Stevens RC, Thöny B and Blau N. Molecular Genetics of Tetrahydrobiopterin-Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. **Human Mutation** 29(1),167-175, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve por objetivo investigar as bases moleculares da fenilcetonúria em pacientes oriundos dos estados do nordeste do Brasil, uma região social e economicamente desfavorecida, onde escasseiam trabalhos desta natureza, e ainda avaliar a triagem neonatal para fenilcetonúria no estado da Bahia,

Lamentavelmente, não foi possível obter dados de três estados (Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte), uma vez que os respectivos SRTN, após contactados, não mostraram interesse em participar do estudo. De especial importância seria a avaliação dos pacientes originários de Pernambuco – a presença de concentração de pacientes no nordeste da Bahia, região que faz divisa com Pernambuco, com características moleculares peculiares (frequência elevada das mutações R252W e E390G) tornaria sumamente interessante a comparação dos resultados.

As análises referentes aos dados epidemiológicos do PNTN limitaram-se ao estado da Bahia, uma vez que não se dispunha de fácil acesso a este tipo de informações dos outros estados. Entretanto, com exceção do Piauí, todos os outros estados participantes enviaram informações clínicas dos pacientes (Anexo 1), o que permitiu estabelecer os estudos de correlação genótipo-fenótipo expostos no artigo 4.

Os dados epidemiológicos da Bahia mostram um programa em ascensão, com algumas metas muito próximas de ser conquistadas, como a cobertura de 100% dos nascidos-vivos, outras já alcançadas, como a coleta descentralizada em todos os municípios do estado, porém ainda com graves problemas a serem sanados, como a idade tardia da coleta do exame de triagem neonatal e a não observância da necessidade de envio imediato das amostras ao laboratório (amostra retida). Tais falhas no programa devem ser corrigidas, sendo uma estratégia adequada a educação continuada de profissionais de saúde, aliada a campanhas de esclarecimento da população sobre o “teste do pezinho”.

A caracterização clínica e demográfica dos pacientes com HPA na Bahia mostra preponderância de fenótipo grave (PKU clássica), ressaltando a importância do diagnóstico e tratamento precoces.

O achado de famílias com baixa renda e escolaridade reflete a realidade da região, onde a inserção no mercado de trabalho (muitas vezes informal) é precoce, limitando o acesso à educação e conseqüentemente reduzindo as oportunidades de crescimento sócio-econômico. Tal característica da população reforça a importância do PNTN como programa de saúde pública, inteiramente custeado pelo SUS.

A presença de recorrência familiar, típica do padrão de herança das HPA, chama a atenção para a necessidade de ampliar a investigação de casos, uma vez que os dados sugerem importante subdiagnóstico da condição. O diagnóstico de PKU em adultos, embora não se correlacione com os excelentes resultados do tratamento precoce, apresenta benefícios ao paciente, devendo ser estimulado (MURPHY *et al.*, 2008).

A triagem inicial de sete mutações teve como objetivo desenvolver uma ferramenta que permitisse a triagem molecular da PKU a custo reduzido, tanto em termos financeiros como no que se refere ao tempo necessário para investigação. Uma vez que não haviam informações sobre mutações no gene da PAH frequentes na região, optou-se por rastrear as mutações mais frequentemente descritas em estudos prévios, especialmente em São Paulo. Tal estratégia mostrou-se bastante eficaz, detacadamente na Bahia e em Alagoas, onde o tamanho da amostra foi representativo da população com diagnóstico de PKU. Vale lembrar que os SRTN são as únicas unidades de saúde credenciadas pelo Ministério da Saúde para realizar o tratamento de PKU, de modo que todos os pacientes com diagnóstico conhecido nos estados estão cadastrados nestes serviços.

Os estudos de correlação entre o genótipo e o fenótipo mostraram baixa concordância. Tal achado é frequente na literatura. Entretanto, a correlação foi razoavelmente adequada no que tange aos pacientes que podem se beneficiar de tratamento alternativo (BH4). Para estes pacientes, poder flexibilizar a dieta será um ganho indescritível em qualidade de vida (BIK-MULTANOWSKI *et al.*, 2008).

Em conclusão, o presente estudo permitiu aumentar o conhecimento sobre as HPA, nos seus aspectos epidemiológicos, clínicos e moleculares, o que pode ser de utilidade no aprimoramento da triagem neonatal como programa de saúde pública, com conseqüentemelhoria da assistência e do cuidado aos pacientes e suas famílias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta AX; Silva, WA; Carvalho, TM; Gomes M; Zago, MA. Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Gene in Brazilian Patients with Phenylketonuria. **Human Mutation.** 17:122-130, 2001.

Almeida AM, Godinho TM, Teles MS, Rehem APP, Jalil HM., Fukuda TG. et al. Avaliação do Programa de Triagem Neonatal na Bahia no ano de 2003. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.** 6(1):85-91, 2006.

APAE Salvador. Manual de Práticas do Programa de Triagem Neonatal na Bahia. Salvador: Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador: 2006.

Barretto J, Silva LR, Leite ME, Boa-Sorte N, Pimentel H, Purificação AC et al. Poor zinc and selenium status in phenylketonuric children and adolescents in Brazil. **Nutrition Research.** 28 (3): 208-211, 2008.

Bickel H, Bachmann C, Beckers R. Neonatal mass screening for metabolic disorders. **Eur. J. Pediatr.** 137:133-139,1981.

Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. **Lancet.** 2:812-813,1953.

Bik-Multanowski M, Didycz B, Mozrzymas R, Nowacka M, Kaluzny L, Cichy W, et al. Quality of life in noncompliant adults with phenylketonuria after resumption of the diet. *J Inherit Metab Dis.* Short Report #133 Online, 2008.

Blau N and Erlandsen H. The metabolic and molecular basis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. **Molecular Genetics and Metabolism.** 82:101-111,2004.

Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. **Lancet.** 23; 376(9750):1417-27, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. INDICADORES DO PROGRAMA NACIONAL DE TRIAGEM NEONATAL. Disponível em URL: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/INDICADORES TRIAGEM NEONATAL.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/INDICADORES_TRIAGEM_NEONATAL.pdf)>. [Acesso 2010 Nov 30].

Burgard P, Luo X, Hoffmann G. Phenylketonuria. In: Sarafoglou K, Hoffmann G, Roth K. eds. **Pediatric Endocrinology and Inborn Errors of Metabolism.** New York:McGraw-Hill, 2009; 163-168.

Carvalho TM, Pimentel-dos-Santos H, Santos ICGP, Vargas P, Pedrosa J. Newborn Screening: A national public health programme in Brazil. **J Inherited Metab Dis.** 30:615, 2007.

Cederbaum S. Phenylketonuria: an update. **Cur Opin Pediatr** 2002; 14: 702-6.

Centerwall S, Centerwall W. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. **Pediatrics.** 105: 120-36, 2002.

Centerwall WR. Phenylketonuria. **JAMA.** 165:2219-392, 1957.

DiLella AG, Kwok SCM, Ledley FD, Marvit J., Woo SLC. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Biochemistry.*, 25 (4): 743–749, 1986.

Eisensmith RC, Woo SLC. Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemias: Mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene. **Human Mutation.** 1(1):13–23, 1992.

Fölling A. Excretion of phenylpyruvic acid in urine as a metabolic anomaly in connection with imbecility. **Nord Med Tidskr.**8:1054-1059, 1934.

Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. **Pediatrics.**32:338-343, 1963.

Guthrie R. The introduction of newborn screening for phenylketonuria. A personal history. **Eur J Pediatr** 155 [Suppl 1] : S4-S5, 1996.

Güttler F , Azen C, Guldberg P, Romstad A, Hanley WB, Levy HL, et al. Impact of the Phenylalanine Hydroxylase Gene on Maternal Phenylketonuria Outcome. **Pediatrics.** 112:1530-1533, 2003.

Hofman K J, Steel G, Kazazian H H, Valle D. Phenylketonuria in U.S. lacks: molecular analysis of the phenylalanine hydroxylase gene. **Am J Hum Genet.** 48(4): 791–798, 1991.

Horner FA, Streamer CW. Effect of phenylalanine-restricted diet on patients with phenylketonuria: clinical observations in three cases. **JAMA.** 161:1628-1630, 1956.

Jervis GA. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. **Proc Soc Exp Biol Med.** 82:514–5, 1953.

McCaman MW, Robins E. Fluorimetric methods for the determination of phenylalanine in serum. **J Lab Clin Med.**59:885-890, 1962.

Millington DS, Kodo N, Teradu N, Roe D, Chace DH. The analysis of diagnostic markers of genetic disorders in human blood and urine using tandem mass spectrometry with liquid secondary ion mass spectrometry. **Int J Mass Spectrom Ion Processes.** 111:211-228, 1991.

Ministério da Saúde. Portaria GM/MS n.º 822/GM. <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2001/GM/GM-822.htm> (accessed on 02/Aug/2010).

MIRA NVM e Marquez UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Rev. Saúde Pública.** 34 (1): 86-96, 2000.

Monteiro LTB, Cândido LMB. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. **Ver. Nutr.** 19(3):381-387, 2006.

Murphy, GH, Johnson SM, Amos A, Weetch E, Hoskin R, Fitzgerald B et al. Adults with untreated phenylketonuria: out of sight, out of mind. **The British Journal of Psychiatry.** 193, 501–502, 2008.

Nascimento ML, Pires MMS, Nassar SM, Ruhland L. Avaliação do Programa de Rastreamento Neonatal para Hipotireoidismo Congênito da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** 47: 75-81, 2003.

Penrose L, Quastel JH. Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem J.* 31:266–74, 1937.

Phenylalanine hydroxylase Locus Knowledgebase [on line] Disponível em URL: <<http://www.pahdb.mcgill.ca/>> [2010 Aug 28].

Ramalho RJR, Ramalho ARO, Oliveira CRP, Aguiar-Oliveira MH. Evolução do Programa de Triagem Neonatal para o Hipotireoidismo Congênito e Fenilcetonúria no Estado de Sergipe de 1995 a 2003. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**48 (6): 890-6, 2004.

Ramos AJS, Rocha AM, Costa ADM, Benício AVL, Ramos ALC, Silva CRA, et al. Avaliação do Programa de Rastreamento de Doenças Congênitas em Campina Grande – PB, Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** 47(3):280-4, 2003.

Santana-da-Silva LC, Carvalho TS, Silva FB, Morari L, Fachel AA, Pires R, et al. Molecular Characterization of phenylketonuria in South Brazil. **Molecular Genetics and Metabolism.** 79:17-24, 2003.

Santos LL, Fonseca CG, Starling, ALP, Januário NJ, Aguiar MJB, Peixoto MGCD et al. Variations in genotype-phenotype correlations in phenylketonuria patients. **Genet. Mol. Res.** 9(1):1-8, 2010.

Santos LL, Magalhães MC, Januário JN, Aguiar MJB, Carvalho MRS. The time has come: a new scene for PKU treatment. **Genet. Mol. Res.** 5 (1): 33-44, 2006.

Scriver, CR, Kaufman, S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill. pp 1667–1724, 2001.

Sullivan JE. - Emotional outcome of adolescents and young adults with early and continuously treated phenylketonuria. **J Pediatr Psychol.** 26(8):477-84, 2001.

Trefz FK, Scheible D, Götz H, Frauendienst-Egger G. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. **J Inherit Metab Dis.** 32(1): 22-26, 2008.

Woo SL, Lindsley AS, Guttler F, Chandra T, Robson KJ. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. **Nature.** 306 (5939):151-5, 1983.

Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet, F, Chery C, Burlina A, Stevens RC, Thöny B and Blau N. Molecular Genetics of Tetrahydrobiopterin-Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. **Human Mutation.** 29(1):167-175, 2008.

APÊNDICE 1 – FICHA PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS

BASES MOLECULARES DA FENILCETONÚRIA NO NORDESTE DO BRASIL	
PROTOCOLO DE ENTREVISTA	
I- IDENTIFICAÇÃO (dos indivíduos com amostras de sangue coletadas):	
NOME:	Nº REGISTRO _____
PACIENTE: _____	
PAI: _____	
MÃE: _____	
OUTROS (especificar parentesco): _____	
DATA DE NASCIMENTO: _____	DATA DA COLETA: _____
II- ENDEREÇO: _____	
III - NATURALIDADE: _____	
IV- ASCENDÊNCIA: _____	
V- ETNIA: () branco () negro () índio () mulato () amarelo/asiático	
VI- CONSANGÜINIDADE PARENTAL: () SIM NÃO ()	
VII- OUTROS CASOS NA FAMÍLIA: () NÃO	
() SIM / especificar quantos e parentesco: _____	
VIII- FORMA DO DIAGNÓSTICO: () screening neonatal () doença	
() outros/especificar: _____	
IX- DOSAGEM DA FENILALANINA (ao diagnóstico): _____	
X- MANIFESTAÇÃO CLÍNICA: () assintomático () sintomático	
XI- TRATAMENTO: () Sim () Não	
início (data ou idade): _____/duração: _____	
resposta terapêutica: () melhora () piora () inalterada	

APÊNDICE 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO INFORMAÇÕES PARA OS PAIS/REPRESENTANTES LEGAIS

TÍTULO DO ESTUDO

“Estudo das Bases Moleculares da Fenilcetonúria no Nordeste do Brasil”.

O QUE É A FENILCETONÚRIA?

O seu filho tem uma doença chamada Fenilcetonúria (PKU). Os pacientes que têm PKU não produzem a enzima fenilalanina hidroxilase no organismo em quantidade suficiente. Por causa disso, eles não conseguem degradar um componente do organismo (o aminoácido fenilalanina), e esta substância acaba se acumulando no corpo. Isto causa alteração cerebral, que leva ao atraso no desenvolvimento da criança, provocando retardo mental, convulsões, comportamento agressivo, etc. Mas, como é possível realizar o diagnóstico ao nascimento (teste do pezinho), o tratamento (dieta pobre em fenilalanina) iniciado ainda no primeiro mês e devendo ser por toda a vida, faz com que a criança seja normal. A PKU é uma doença genética causada por duas mutações transmitidas pelos pais, ou seja, os pais precisam ter cada um uma mutação (portador normal, sem doença), e possuem um risco de 25% de ter um filho com a doença quando ambos transmitir as suas mutações, existindo na criança com PKU, as duas mutações herdadas dos pais. Portanto, a pessoa com PKU apresenta duas mutações que causam a alteração na enzima.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

O objetivo deste estudo é identificar a causa genética (as mutações - alterações no DNA) responsável pelo aparecimento da PKU no seu filho, sendo este exame o diagnóstico molecular (diagnóstico definitivo) que mostra as mutações que levaram à não produção da enzima fenilalanina hidroxilase, nas pessoas com Fenilcetonúria que foram detectadas pelo teste do pezinho.

COMO E ONDE ESTE ESTUDO SERÁ REALIZADO?

Deverão participar deste estudo pacientes da região Nordeste do Brasil. Os pacientes selecionados serão solicitados a fornecer informações sobre sua história médica. Se você permitir, estas informações poderão ser obtidas através do seu médico ou dos registros médicos hospitalares. Os pacientes que estiverem comparecendo à consulta de retorno serão convidados a participar deste estudo quando será realizada o seguinte procedimento:

- **Coleta de sangue** (5 a 10 mL), o que envolve fincar uma agulha no braço. Esse material coletado será processado e analisado no Laboratório de Biologia Molecular do LASP/CPqGM/FIOCRUZ (Laboratório Avançado de Saúde Pública do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz), para se identificar as mutações causadoras da doença.

QUAIS SÃO OS RISCOS DESTE ESTUDO?

A coleta de sangue poderá causar um desconforto temporário por causa da picada de agulha, hematoma e raramente, infecção. Às vezes, uma pessoa pode ficar tonta ou desmaiar quando o sangue for coletado.

QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS DESTE ESTUDO?

Com esse diagnóstico, poderá ser possível estabelecer correlação com a gravidade da doença e, com isso, oferecer melhor tratamento, isto é, ajustar a dieta de acordo com a gravidade das mutações detectadas pelo estudo molecular, ou seja, de acordo com as mutações detectadas, se mais ou menos graves, permitir uma dieta mais ou menos rigorosa em relação à quantidade de fenilalanina que pode ser colocada na alimentação. Além disso, para as famílias interessadas, este estudo pode ser oferecido para encontrar pessoas portadoras da mutação e normais, ou seja, identificar pessoas da mesma família que têm o risco de ter um filho com PKU.

POSSO RECUSAR A PARTICIPAÇÃO?

Seu filho não é obrigado a participar neste estudo. A sua participação neste estudo é voluntária. A recusa em participar não terá conseqüências para os seus cuidados

presentes ou futuros. Seu filho poderá se retirar do estudo a qualquer momento. Os médicos do estudo podem decidir parar o estudo ou não permitir a participação de seu filho se isto for do seu melhor interesse.

TENHO QUE PAGAR PARA PARTICIPAR ?

Não há nenhum custo para participar dessa pesquisa. Seu filho não será pago para participar deste estudo.

E SE EU/MEU FILHO FOR PREJUDICADO?

A Dra. Angelina Xavier Acosta deverá ser notificada se você suspeitar que seu filho foi prejudicado por estar no estudo.

AS INFORMAÇÕES SOBRE MEU FILHO SE TORNARÃO PÚBLICAS?

A identidade de seu filho e outras informações pessoais obtidas neste estudo serão confidenciais. Informações científicas e médicas obtidas neste estudo, das quais a identidade de seu filho não poderá ser revelada, deverão ser apresentadas em encontros e publicadas a fim de tornar as informações obtidas neste estudo de benefício para os outros.

QUEM POSSO CONTACTAR PARA DÚVIDAS?

Você está livre para fazer perguntas sobre este estudo clínico a qualquer momento. Quando você tiver dúvidas relacionadas a este estudo, poderá contactar:

-Dra. Angelina Xavier Acosta

-Dra Tatiana Amorim

LASP/CPqGM/FIOCRUZ

Rua Wlademar Falcão 121, Brotas

Salvador-Bahia

Telefone: (71) 3568822 ramal 255

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____

manifesto meu consentimento com envolvimento do meu filho no projeto de pesquisa intitulado:

“Estudo das Bases Moleculares da Fenilcetonúria no Nordeste do Brasil”.

1. A natureza e objetivo do projeto de pesquisa, descritos na Folha de Informação em anexo, foram explicadas a mim. Eu compreendo e concordo em participar.
2. Eu compreendo que meu filho poderá não ter benefício direto por participar do estudo.
3. Eu entendo que os possíveis riscos e/ou efeitos adversos, desconfortos e inconveniências, como foi destacado na Folha de Informações, foram explicados a mim.
4. Eu compreendo que, apesar das informações obtidas no estudo poderem ser publicadas, elas serão confidenciais e meu filho não será identificado a partir delas.
5. Eu compreendo que posso retirar meu filho do estudo em qualquer etapa e que isto não irá afetar os cuidados médicos ou quaisquer outros aspectos da relação recebidos pelo meu filho.
6. Eu compreendo que não haverá pagamento para meu filho por participar deste estudo.
7. Eu tive a oportunidade de discutir a participação de meu filho neste projeto de pesquisa com um membro da família ou amigo e/ou tive a oportunidade de ter um membro da família ou amigo presente enquanto o projeto de pesquisa estava sendo explicado pelo pesquisador.
8. Eu estou ciente de que devo guardar uma cópia do Termo de Consentimento, quando completo, e da Folha de Informações.
9. Eu concordo que o material (sangue) coletado de meu filho seja utilizado no projeto acima.

Assinatura: _____

Relação com Paciente: _____

Nome Completo do Paciente: _____

Data: _____

ANEXO 1 – PROTOCOLOS PARA RFLP

BASES MOLECULARES DA FENILCETONÚRIA

PROTOCOLO LABORATORIAL SUGERIDO PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES

EXON 11 - Mutações IVS10nt-11g→a e V388M

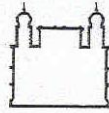
Mutação	IVS10nt-11g→a
*Região / Tamanho	Exon 11 / 301pb
*Primers	5' TGAGAGAAGGGGCACAAATG 3' 5' GCCAACCACCCACAGATGAG 3'
*Protocolo reação PCR (Volume final de 25µl)	DNA - 100ng Bf (1,5mM com 10% BSA) - 2,5µl dNTP (1,25mM) - 2,0µl P1+P2 (2,5µM cada) - 5,0µl Taq - 0,2U/µl
*Ciclos PCR	94°C – 6' } 1x } 72°C – 30' } 35x } 72°C – 10' } 57°C – 2' } } 95°C – 30' } } 4°C 57°C – 1' } }
Enzima de restrição	Ddel (mutação cria sítio de restrição)
Condições da digestão (volume final de 12,5µl)	Bf 1x - 6µl Ddel 5U - 0,5µl Produto PCR - 6µl
Mapa de restrição (gel agarose 2%)	HMS (-/-) – 301pb HMM (+/+) – 223 pb e 78pb HET (+/-) – 301pb, 223pb, 78pb
Mutação	V388M
Enzima de restrição	BsaAI (mutação abole sítio de restrição)
Condições da digestão (volume final de 12,5µl)	Bf 1x - 6µl BsaI 5U - 0,5µl Produto PCR - 6µl
Mapa de restrição (gel agarose 2%)	HMS (+/+) – 187pb e 114pb HMM (-/-) – 301pb HET (+/-) – 301pb, 187pb, 114pb
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	Acosta <i>et al</i> , 2001

amostra)	HET (+/-) – 263pb, 147pb, 116pb
Mutação	R252W
Enzima de restrição	Aval (mutação abole sítio de restrição)
Condições da digestão (volume final de 16,5µl)	Bf OPA 2x - 8µl Aval (New England) 5U - 0,5µl 37°C 6h a ON Produto PCR - 8µl
Mapa de restrição (gel agarose 2%; 8µl amostra)	HMS (+/+) – 177pb, 86pb HMM (-/-) – 263pb HET (+/-) – 263pb, 177pb, 86pb
Mutação	R261X
Enzima de restrição	Ddel (mutação cria sítio de restrição)
Condições da digestão (volume final de 12,6µl)	Bf Nebf3 1x - 6µl Ddel (New England) 5U - 0,6µl 37°C 6h a ON Produto PCR - 6µl
Mapa de restrição (gel agarose 2%; 8µl amostra)	HMS (-/-) – 263pb HMM (+/+) – 148pb, 115pb HET (+/-) – 263pb, 148pb, 115pb
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	Acosta <i>et al</i> , 2001

EXON 12 - Mutação R408W

Região / Tamanho	Exon 12 / 239pb
Primers	12.1- ATGCCACTGAGAACTCTCTT 12.2- GATTACTGAGAAACCGAGTGGCCT
Protocolo reação PCR (Volume final de 25µl)	DNA - 100ng Bf (1,5mM com 10% BSA) - 2,5µl dNTP (1,25mM) - 2,0µl P1+P2 (2,5µM cada) - 5,0µl Taq - 0,2U/µl
Ciclos PCR	94°C – 6' } 1x 10' } 59°C – 2' } 72°C – 30' } 35x 95°C – 30' } 59°C – 1' } 72°C – 4°C
Enzima de restrição	StyI (mutação cria sítio de restrição)
Condições da digestão (volume final de 12,5µl)	Bf 1x - 6µl StyI 5U - 0,5µl 37° C 6h a ON Produto PCR - 6µl
Mapa de restrição (gel agarose 2%; 8µl amostra)	HMS (+/+) – 238pb HMM (-/-) – 141pb e 97pb HET (+/-) – 238pb, 141pb, 97pb
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	Acosta <i>et al</i> , 2001

ANEXO 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROJETO DE DOUTORADO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PARECER Nº 25/2003

Protocolo: 113

Projeto de Pesquisa: “Estudo das bases da fenilcetonúria no Nordeste do Brasil.”

Pesquisador Responsável: Dra. Angelina Xavier Acosta

Instituição ou Departamento: FIOCRUZ/CPqGM/LASP

Considerações:

Após a análise ética do projeto, tendo sido feitos pelo responsável os esclarecimentos solicitados e pelo mesmo adequadas às pendências apontadas, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 13 de março de 2003

Dr. Ítalo A. Sherlock
Coordenador do
CEP-CPqGM/FIOCRUZ

Comitê de Ética em Pesquisa - Rua Waldemar Falcão, nº 121, Brotas, Salvador, Bahia, CEP 40295-001, Brasil

Tel: (71) 356-0129 Fax: (71) 356-2155
e-mail: sherlock@cpqgm.fiocruz.br

ANEXO 3 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O ARTIGO 2

FUNDAÇÃO BAHIANA PARA DESENVOLVIMENTO DAS CIÊNCIAS
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OFÍCIO N. 215/2007

Salvador, 18 de dezembro de 2007.

Senhora Orientadora,

De ordem da Snra. Coordenadora deste CEP-Comitê de Ética em Pesquisa da FBDC, Profa. Lucíola Maria Lopes Crisóstomo, e com referência ao Protocolo de Pesquisa n. 56/2007, intitulado “Avaliação do programa de triagem neonatal para fenilcetonúria na Bahia, de 1992 a 2007”, vimos confirmar o recebimento, em data de 21.11.07, do cumprimento das pendências assinaladas pelo Pareceirista, pelo que consideramos APROVADO, o citado protocolo.

Cordiais saudações,

Lourdes Hummel

Secretária do CEP/FBDC.

Ilma. Sra.

PROF^a. TATIANA REGIA SUZANA AMORIM BOA SORTE
Rua Almirante Bsauroso, 96 / 301
CEP.41.950-359 – Salvador-Bahia.