

Caracterização genético-clínica de pacientes com fenilcetonúria no Estado de Alagoas

Genetic and clinical characterization of patients with phenylketonuria in Alagoas state, Brazil

Emerson de Santana Santos¹, Maria Alzira Almeida Rocha², Helen Mayara Nunes da Silva Oliveira², Doriane Costa³, Tatiana Amorim⁴, Angelina Xavier Acosta⁵

¹ Professor auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Alagoas.

² Aluno do Curso de Medicina da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas.

³ Assistente Social da "Casa do Pezinho", Maceió, Alagoas.

⁴ Doutora em Ciências. Professora Adjunta de Genética Médica, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Coordenadora de Pesquisa Científica do Serviço de Referência em Triagem Neonatal – APAE, Salvador, BA.

⁵ Doutora em Clínica Médica. Professora Adjunta do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia. Chefe do Serviço de Genética Médica, Universidade Federal da Bahia.

RESUMO

Objetivos: Caracterizar o perfil genético-clínico de pacientes com fenilcetonúria em Alagoas, diagnosticados e acompanhados pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal.

Métodos: Pacientes com fenilcetonúria, assistidos pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal de Alagoas, foram submetidos a coleta de sangue para rastrear mutações genéticas determinantes da variação fenotípica da doença. Concomitantemente, os pacientes ou seus responsáveis responderam a um questionário padronizado para coleta de dados clínicos e epidemiológicos.

Resultados: Foram acompanhados 20 pacientes, sendo 14 do sexo masculino e seis do sexo feminino, pertencentes a 18 famílias. A idade dos pacientes estudados variou de 3 a 31 anos. Houve consanguinidade parental em 3/18 famílias; recorrência familiar 3/18; 3/20 tiveram diagnóstico tardio; 2/20 interromperam temporariamente o tratamento; 1/20 não aderiu ao tratamento; e 6/20 apresentam manifestações clínicas. A análise das mutações foi concluída em 15/20 pacientes. As mutações encontradas no gene da fenilalanina hidroxilase foram: R261Q-homozigose (2 pacientes); V388M/I65T (1); R270K/V388M (1); I65T/L348V (1); IVS10nt11G>A-homozigose (2); V388M/R252W (1); R261Q/I65T (1); IVS10nt11G>A/R252W (1); V388M/IVS10nt11G>A (3); R261Q/R252W (1); R261Q/V388M (1).

Conclusões: O genótipo V388M/IVS10nt11G>A foi o mais prevalente. Trinta por cento dos pacientes foram sintomáticos, provavelmente pela natureza das mutações, não adesão ao tratamento, tratamento inadequado e/ou diagnóstico tardio.

DESCRITORES: FENILCETONÚRIA; FENILALANINA HIDROXILASE; ERROS INATOS DO METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS; GENÓTIPO; FENÓTIPO; TRIAGEM NEONATAL; MUTAÇÃO; RETARDO MENTAL; PROGNÓSTICO.

ABSTRACT

Aims: Characterizing the genetic/clinical profile of patients diagnosed with Phenylketonuria in Alagoas, monitored by the National Program of Newborn Screening.

Methods: Patients with phenylketonuria, assisted by the Reference Center for Neonatal Screening of Alagoas, underwent blood sampling for detecting genetic determinants for the phenotypic variability of the disease. Concomitantly, patients or their guardians answered a standardized questionnaire for collection of clinical and epidemiological data.

Results: Twenty patients (14 males and 6 females), belonging to 18 families, were monitored. Age ranged from 3-31 (mean age 10.35). We found parental consanguinity in 3/18 families; familial recurrence was 3/18; 3/20 had late diagnosis; 2/20 interrupted treatment for some time; 1/20 did not adhere to treatment; and 6/20 had clinical manifestations. Analysis of mutations was concluded in 15/20 patients. Mutations found in the phenylalanine hydroxylase gene were: R261Q-homozygous (2 patients); V388M/I65T (1); R270K/V388M (1); I65T/L348V (1); IVS10nt11G>A-homozygous (2); V388M/R252W (1); R261Q/I65T (1); IVS10nt11G>A/R252W (1); V388M/IVS10nt11G>A (3); R261Q/R252W (1); R261Q/V388M (1).

Conclusions: V388M/IVS10nt11G>A was the most prevailing genotype. Thirty percent of patients were symptomatic, probably due to the nature of mutations, non-adherence to treatment, inadequate treatment and/or late diagnosis.

KEY WORDS: PHENYLKETONURIA; PHENYLALANINE HYDROXYLASE; AMINO ACID METABOLISM, INBORN ERRORS; GENOTYPE; FENOTYPE; NEONATAL SCREENING; MUTATION; INTELLECTUAL DISABILITY; PROGNOSIS.

Recebido: dezembro de 2011. Aceito: maio de 2012.

Endereço para correspondência/Corresponding Author:
EMERSON DE SANTANA SANTOS
Rua Progresso, 226 – Farol
57055-200, Maceió, AL
Telefone: (82) 9974-0254
E-mail: vicani@uol.com.br

INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (PKU) é o mais comum dos erros inatos do metabolismo dos aminoácidos. Sua frequência no Brasil varia entre 1:15.000 e 25.000 nascidos vivos.^{1,2} Na rede de assistência pública à saúde, a triagem dos pacientes com PKU deve ser feita idealmente entre o terceiro e o sétimo dia após o nascimento. O Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) vem sendo implantado em cada estado brasileiro em várias fases, que variam conforme as doenças incluídas na triagem. Em Alagoas, o PNTN foi habilitado para a fase I (que inclui a triagem para PKU e hipotireoidismo congênito) em 11 de outubro de 2001, com início de funcionamento efetivo em 2002. O serviço de referência em triagem neonatal no estado é a Maternidade Escola Santa Mônica, em Maceió, onde funciona a “Casa do Pezinho”, ambulatório que presta assistência aos pacientes triados provenientes de todas as cidades alagoanas.^{3,4}

A PKU é uma doença resultante de mutação no gene da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), que em última instância, leva ao acúmulo da fenilalanina e de seus metabólitos secundários, com conseqüente prejuízo da mielinização, síntese de proteínas e de neurotransmissores.^{5,6} O recém-nascido com PKU não possui anormalidades aparentes ao nascimento e geralmente é assintomático durante os primeiros meses de vida. Normalmente, é por volta do sexto mês que começam a ser observados os déficits causados pela doença, como retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, embora a doença possa ser detectada antes dessa idade, devido à elevação dos níveis sanguíneos de fenilalanina do recém-nascido fenilcetonúrico nas primeiras semanas, resultante da alimentação proteica, incluindo o leite materno. O retardo mental é a seqüela mais grave desse distúrbio metabólico.^{7,8,9}

O tratamento da hiperfenilalaninemia consiste em uma dieta de baixa concentração de fenilalanina, capaz de manter baixa concentração plasmática desse aminoácido. Há um grupo de pacientes, correspondente a aproximadamente 40% da população de fenilcetonúricos, responsivos a tetrahydrobiopterina (BH₄), um cofator presente na conversão da fenilalanina em tirosina, reação alterada pelas mutações no gene da PAH. Nesses indivíduos, a mutação causadora da PKU permite a produção de alguma quantidade de enzima funcionante (atividade enzimática residual). Por isso, eles apresentam maior tolerância à dieta protéica e seu fenótipo tende a ser mais leve. O uso do BH₄ estimula a atividade enzimática residual, viabilizando a hidroxilação mais efetiva da fenilalanina em tirosina,

e assim reduzindo a necessidade de restrição deste aminoácido na dieta. Segundo Bemegger et al.,¹¹ cerca de 30% das hiperfenilalaninemias, correspondentes ou não à PKU, se beneficiariam com a reposição de BH₄ na posologia de 20 mg/kg. Contudo, este é um tratamento oneroso que, para ser financiado pela rede pública, precisa necessariamente de estudo molecular prévio evidenciando as mutações responsivas a esta terapia.¹⁰⁻¹²

Neste contexto, o diagnóstico precoce é crucial no sucesso da terapêutica proposta ao paciente, podendo inclusive identificar os genótipos responsivos ao cofator BH₄. No entanto, o diagnóstico convencional de PKU, oferecido pelos serviços de referência em triagem neonatal no Brasil, é incipiente na determinação precisa do padrão de expressão da doença, sendo necessários diagnósticos diferenciais com as demais hiperfenilalaninemias. A realização de estudos moleculares para PKU é uma alternativa para estas dificuldades, pois oferece confirmação precoce e definitiva através do rastreamento da mutação causadora da doença.^{5,7,10}

A PAH humana é codificada por um gene polimórfico, de cópia única, mapeado no cromossomo 12, região 12q22-q24.1. Segundo o Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase (PAHdb)¹³ há mais de 500 mutações descritas para o gene da PAH, incluindo os tipos *missense*, deleções, *splicing*, silenciosas, *nonsense* e inserção. Esta variabilidade alélica propicia a existência de fenótipos múltiplos e de diferentes respostas terapêuticas em situações de intervenção clínica e temporal compatíveis.^{6,13}

Assim, o mapeamento dessas mutações através de estudos moleculares deve ser realizado como ferramenta diagnóstica mais acurada da PKU, especialmente nos casos onde a conclusão diagnóstica for duvidosa. Desta forma, é possível melhor correlação genético-clínica e conseqüentemente uma proposta terapêutica direcionada às necessidades de cada paciente, com maiores chances de êxito.^{7,14}

MÉTODOS

Este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, com aprovação pelo protocolo número 1462, realizado conforme Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

A amostragem foi não probabilística por conveniência, sendo incluídos todos os indivíduos diagnosticados com PKU, assistidos pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal de Alagoas e excluídos os portadores das demais hiperfenilalaninemias. Esses

pacientes são assistidos na “Casa do Pezinho”, ambulatório pertencente à Maternidade Escola Santa Mônica, em Maceió, Alagoas, onde a pesquisa foi realizada.

Aos indivíduos elegíveis e/ou seus responsáveis legais, proferiu-se uma palestra educativa sobre PKU e seu padrão de determinação genética. Após os esclarecimentos, os sujeitos foram convidados a participar voluntariamente do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As variáveis analisadas foram: sexo, idade, consanguinidade parental, recorrência familiar e manifestações clínicas de deficiência mental e/ou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, frequência da PKU em Alagoas, frequência e caracterização das mutações. Para caracterização da população estudada aplicou-se um questionário para coleta de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes e de seus pais. Também foram colhidas amostras de sangue venoso, cerca de 5,0 mL em tubos de Vacutainer contendo anticoagulante EDTA, que foram enviados para o Laboratório Avançado de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) de Salvador, Bahia, onde foi realizado o estudo molecular.

As amostras foram amplificadas por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando técnica previamente descrita por Saiki et al.¹⁵ Foram investigadas sete mutações mais frequentes em estudos brasileiros anteriores: 16,17 IVS10nt11g→a, V388M, R261Q, R261X, R252W, I65T e R408W, através da técnica 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.¹⁵⁻¹⁸

A correlação genótipo/fenótipo foi estabelecida a partir das atividades enzimáticas residuais previstas

para cada mutação mapeada, previamente descrita por Guldberg et al.,¹⁹ trabalho utilizado como base para o estabelecimento da relação supracitada. R270K foi a única mutação que não esteve presente naquele estudo, assim, o genótipo que incluiu esta mutação foi excluído da análise, que constou então de 14 indivíduos, cujos dados (genótipo, fenótipo previsto e fenótipo observado) estavam disponíveis.

Valores arbitrários (AV) foram atribuídos a cada mutação: AV = 1 para a mutação PKU clássica; AV = 2 para PKU moderada; AV = 4 para a mutação PKU leve, e AV = 8 para não-PKU mutação HPA. A soma dos AV em cada genótipo definiu o fenótipo previsto por Guldberg et al.¹⁹

Os dados coletados em formulário padronizado foram inseridos em uma planilha eletrônica de dados (Microsoft Excel® 2003. Redmond, WA, EUA). As frequências foram calculadas em número absoluto e em porcentagem.

RESULTADOS

Foram acompanhados 20 pacientes, pertencentes a 18 famílias. A distribuição por sexo, idade, consanguinidade parental e recorrência familiar encontram-se expostos na Tabela 2. Dos 20 pacientes, seis apresentaram manifestações clínicas de deficiência mental e/ou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. Em três deles o diagnóstico foi tardio, em dois pacientes houve interrupção temporária do tratamento e um paciente não aderiu ao tratamento (Tabela 2).

A investigação molecular do gene da PAH foi realizada nos 20 pacientes, com resultados conclusivos em 15 deles. Dos 15 resultados, dois procederam de investigação molecular realizada na rede privada; contudo, também foram assistidos na “Casa do Pezinho” no decorrer de todo o tratamento.

Tabela 1. Primers e endonucleases de restrição utilizados para identificação de mutações de ponto no gene da enzima fenilalanina hidroxilase.

| Mutações | Região | Endonuclease de restrição | Primers (5'-3') |
|--------------|---------|---------------------------|--|
| V388M | Exon 11 | BsaAl | 5'TGAGAGAAGGGGCACAAATG3'D |
| IVS10nt11g>a | | Ddel | 5'GCCAACCCACACAGATGAG3'R |
| R261Q | Exon 7 | Hinfl | 5'GGTGATGAGCTTTGAGTTTCTTTCTTC3'D |
| R261X | | Dde | 5'AGCAAATGAACCCAAACCTC3'R |
| R252W | | Aval | |
| I65T | Exon 3 | TagI | 5' TTAGTTCCTGTGACTGTCTC 3'D 5' AACGAGAAGGTCTAGATTCG 3'R |
| R408W | Exon 12 | Sty I | 5'ATGCCACTGAGAACTCTCTT3'D 5'GATTACTGAGAAACCGAGTGGCC3'R |

Tabela 2. Caracterização clinicoepidemiológica de 20 pacientes com fenilcetonúria no estado de Alagoas, 2011.

| Variáveis | Número de pacientes | Porcentagem (%) |
|------------------------------|---------------------|-----------------|
| Sexo | | |
| Masculino | 14 | 70 |
| Feminino | 6 | 30 |
| Idade (anos completos) | | |
| 3-10 | 11 | 55 |
| 11-20 | 8 | 40 |
| 21-31 | 1 | 5 |
| Manifestações clínicas (n=6) | | |
| Déficit leve | 1 | 16,66 |
| Déficit moderado | 2 | 33,33 |
| Déficit grave | 3 | 50 |
| Diagnóstico tardio | 3 | 50 |
| Interrupção do tratamento | 2 | 33,33 |
| Não adesão ao tratamento | 1 | 16,66 |

As mutações encontradas foram: V388M, I65T, R261Q, R252W, R270K, L348V – referentes ao tipo *missense*; IVS10-11G>A – tipo *splice*. Na frequência global das mutações houve predomínio do tipo *missense* e, individualmente, a mutação mais encontrada foi do tipo *splice* (Tabela 3).

Das sete mutações encontradas a mais frequente foi IVS10-11G>A (8/15) 53,33%; seguida de V388M e R261Q, ambas com (7/15) 46,66%; as terceiras mais prevalentes foram R252W e I65T com (3/15) 20%; por fim, R270K e L348V com (1/15) 6,66% de prevalência cada.

A disposição dos genótipos mutantes, localização dos éxons, tipos de mutações e número de pacientes afetados para cada genótipo mutante encontram-se na Tabela 3. O paciente com o genótipo IVS10-11G>A/R252W apresentou a manifestação clínica mais intensa, com retardo de desenvolvimento psicomotor grave. Já o paciente com genótipo V388M/I65T apresentou melhor reposta ao tratamento, apesar do diagnóstico tardio com conseqüente atraso no início do tratamento.

A correlação genótipo/fenótipo pôde ser realizada em 14/15 pacientes cujas mutações foram devidamente mapeadas. Isso se deu porque a mutação R270K, encontrada em uma das duas análises provenientes da rede privada, não foi descrita no sistema de predição de fenótipos proposto por Guldborg et al.¹⁹ Observou-se PKU clássica em 9/14 (64,28%) pacientes e os demais fenótipos (42,85%) foram moderados/leves. As mutações encontradas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 3. Caracterização genética em afetados pela fenilcetonúria em Alagoas, 2011.

| Genótipos mutantes (PAH) | Éxon da PAH | Tipo da mutação | Número de pacientes |
|--------------------------|------------------|--------------------------|---------------------|
| R261Q – homozigose | Éxon 7 | <i>Missense</i> | 2 |
| V388M /I65T | Éxon 11/ Éxon7 | <i>Missense/Missense</i> | 1 |
| R270K /V388M | Éxon 7/ Éxon 11 | <i>Missense/Missense</i> | 1 |
| I65T /L348V | Éxon7/ Éxon 7 | <i>Missense/Missense</i> | 1 |
| IVS10-11G>A – homozigose | Éxon 11 | <i>Splice</i> | 2 |
| V388M /R252W | Éxon 11/ Éxon7 | <i>Missense/Missense</i> | 1 |
| R261Q/ I65T | Éxon 7/ Éxon 3 | <i>Missense/Missense</i> | 1 |
| IVS10-11G>A/R252W | Éxon 11/ Éxon7 | <i>Splice/Missense</i> | 1 |
| V388M/ IVS10-11G>A | Éxon 11/ Éxon 11 | <i>Missense/Splice</i> | 3 |
| R261Q /R252W | Éxon 7/ Éxon 7 | <i>Missense/Missense</i> | 1 |
| R261Q /V388M | Éxon 7/ Éxon 11 | <i>Missense/Missense</i> | 1 |

Tabela 4. Correlação genótipo/fenótipo em afetados pela fenilcetonúria em Alagoas, 2011.

| Genótipo | Fenótipo previsto | Fenótipo observado |
|--------------------------|-------------------|--------------------|
| R261Q/V388M | PKU moderada/leve | PKU clássica |
| V388M/I65T | PKU moderada/leve | PKU clássica |
| V388M/ IVS10-11G>A | PKU moderada/leve | PKU clássica |
| V388M/R252W | PKU clássica | PKU clássica |
| IVS10-11G>A/R252W | PKU clássica | PKU clássica |
| IVS10-11G>A – homozigose | PKU clássica | PKU clássica |
| I65T/L348V | PKU moderada/leve | PKU moderada/leve |
| R261Q/I65T | PKU moderada/leve | PKU moderada/leve |
| R261Q/R252W | PKU moderada/leve | PKU moderada/leve |
| R261Q – homozigose | PKU moderada/leve | PKU moderada/leve |

DISCUSSÃO

A diferença na proporção dos sexos, com maior prevalência de pacientes masculinos, possivelmente ocorreu devido ao pequeno número da amostra, uma vez que a PKU apresenta padrão de herança autossômica recessiva.^{20,21} A recorrência familiar de PKU na irmandade dos pacientes estudados foi de 3/18 (16,66%). Este dado é explicado pelo risco de 25% de recorrência a cada gestação, esperado em casais heterozigotos para doenças autossômicas recessivas.^{20,22}

Observou-se consanguinidade parental em 16,66% (3/18) da amostra, o que genericamente configura fator de risco para o surgimento de doenças autossômicas recessivas, como PKU. Entretanto, dois pacientes com pais consanguíneos apresentaram mutações em heterozigose composta. Para Thompson & Thompson²¹ estes genes mutantes seriam populacionais e a condição de parentesco entre os genitores, um fator acidental que não deve ter configurado aumento do risco de ocorrência de PKU.^{7,21}

O diagnóstico pela triagem neonatal foi realizado em 85% (17/20) dos pacientes. Os demais tiveram a confirmação tardia da doença, através da existência de deficiência mental de etiologia não esclarecida. Em um dos casos realizou-se busca diagnóstica da deficiência mental apresentada e no outro, diagnóstico prévio de PKU em irmão mais novo. Nestes pacientes, assim como observado por Amorim et al.,⁵ a terapêutica foi instituída tardiamente, com melhora clínica variável, mas sem remissão dos déficits cognitivos apresentados no momento do diagnóstico.^{5,23}

A idade dos pacientes no momento da avaliação variou de 3 a 31 anos (média 10,35 ± 7,69). Já que o estado de Alagoas foi habilitado para a fase I do PNTN em 2001, a maioria dos diagnósticos tardios, (dois dos três casos), ocorreu em indivíduos que nasceram antes desse período. Esse contingente diminuiu após 2002, com apenas um caso diagnosticado tardiamente, o que fala a favor de uma ação positiva quanto à triagem dos nascidos vivos no estado, com cobertura de aproximadamente 71% em 2007.⁴

Dos 20 pacientes participantes do estudo, seis são sintomáticos, apresentando atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. Destes, um apresenta sintomatologia leve, em dois observa-se déficit moderado e a metade restante do grupo é gravemente comprometida. Diagnóstico precoce e adesão ao tratamento não caracterizaram uniformemente o grupo, já que se observa espectro clínico de leve a grave em pacientes em cuja história de diagnóstico tardio e não adesão ao tratamento estão igualmente presentes.^{7,20,23,24}

Fatores ambientais e genéticos parecem ser determinantes na apresentação clínica da PKU, pois em

pacientes com a mesma mutação (IVS10-11G>A-homozigose), mas com abordagem diagnóstica e adesão terapêutica diferentes, a evolução foi mais favorável, porém não isentou de sintomatologia o paciente com assistência mais adequada.^{18,20-29}

A correlação genótipo/fenótipo foi realizada em 14/15 pacientes cujas mutações foram mapeadas, já que R270K não foi descrita no estudo de Guldberg et al.¹⁹ e fez parte do genótipo encontrado em um paciente. Observou-se PKU clássica em 9/14 (64,28%) pacientes, mas em cinco deles o genótipo observado não foi condizente com o esperado, uma vez que este tinha PKU moderada/leve. Todas as distorções ocorreram quando o genótipo esperado seria o moderado/leve e o encontrado foi PKU clássica. Isso pode ter ocorrido porque essas mutações não apresentaram em conjunto a atividade enzimática residual esperada, como observado por Bercovich et al.²⁰ Em 9/14 dos casos os fenótipos corresponderam ao esperado a partir de seus respectivos genótipos. Destes, 55,55% determinaram a variante moderada/leve e os demais a clássica. Este dado é pontualmente importante porque há maior frequência de responsividade à BH₄ em pacientes com PKU moderada/leve.^{12,19,20,29} Neste estudo destacam-se as mutações I65T e V388M com frequência de 20% e 33,33% respectivamente, onde a responsividade ao cofator supracitado é descrita, conforme Trefz et al.³⁰

O genótipo IVS10-11G>A/R252W, cujo fenótipo esperado e observado foi de PKU clássica, apresentou maior manifestação clínica, com retardo mental grave e total dependência para realização de atividades de vida diária. Em estudos europeus e também realizados no sul e sudeste do Brasil, a mutação R252W correlacionou-se com formas graves da doença. Já o genótipo V388M/I65T, onde o fenótipo esperado foi de PKU moderada/leve e o encontrado correspondeu a PKU clássica, esteve relacionado à melhor resposta ao tratamento, pois o paciente afetado, apesar de diagnóstico tardio e atraso no início do tratamento, apresentou retardo mental leve. Trabalhos demonstram que a proteína mutante V388M tem se apresentado como uma das poucas mutações estáveis da PAH.^{16-19, 25-27, 30}

Mediante o diagnóstico, seja por triagem neonatal ou mais tardio, foi instituído o tratamento com restrição alimentar, com dieta pobre em proteínas e uso da fórmula suplementar. Nos pacientes com diagnóstico precoce e conduta terapêutica adequada a adesão foi maior e não foram evidenciados sinais de déficits neuropsicológicos, exceto em três pacientes, o que pode ser explicado por transgressão alimentar não detectada pelo método do estudo ou ainda por aspectos não esclarecidos do padrão de expressão de suas respectivas mutações. A dificuldade de introdução tardia ou reintrodução ao

tratamento pode ter ocorrido pela adaptação de paladar já feita no sentido da dieta convencional e/ou pelo próprio retardo mental, que diminui a crítica do paciente no tocante à importância de uma adesão permanente e estrita à dieta.^{7,8, 20, 31, 32}

Segundo o PAHdb,¹³ as mutações mais encontradas no mundo são as do tipo *missense*, com 60,49% de prevalência. Nesta amostra houve prevalência de 73,33%; o segundo tipo mais encontrado foi *splice* com 26,66%, o que não condiz com a literatura, já que o segundo tipo mais prevalente é deleção com 13,48% e o *splice* apareceu como terceira mais frequente, com 10,99% de prevalência a nível mundial. Entretanto, tal discrepância pode se dar pelo fato de que apenas mutações selecionadas foram investigadas nesta amostra.^{13, 33}

Não foi possível detectar os alelos mutantes em 25% (5/20) das amostras analisadas. Isto pode ter ocorrido pelo fato das mutações não estarem no espectro dos alelos propostos para a análise molecular, que foi selecionado a partir das mutações mais comumente descritas na literatura. A investigação complementar com sequenciamento completo do gene da PAH neste grupo, necessária para fornecer um perfil mais completo das mutações, encontra-se em andamento.³³

Segundo os trabalhos de Kayaalp et al.,³⁴ Scriver et al.³⁵ e Santos et al.,¹⁸ o genótipo não é capaz de prever adequadamente o fenótipo bioquímico nas hiperfenilalaninemias (correspondentes ou não a PKU). Fatores como absorção intestinal, taxa de depuração hepática e influência de outros genes parecem estar envolvidos no processo. Neste estudo, os genótipos encontrados para PKU foram capazes de prever adequadamente o fenótipo em 64,28% dos casos.

Deverão ser realizados estudos posteriores com este grupo de pacientes, para que se possa acompanhar a evolução de cada um deles segundo seu genótipo para PAH. Com esses subsídios, as autoridades da Saúde Pública local e nacional poderão ser esclarecidas sobre a importância desta investigação paralelamente à triagem neonatal, como estratégia para diagnóstico definitivo de PKU nos casos duvidosos e plano terapêutico direcionado segundo as necessidades de cada paciente. Salienta-se a terapia de reposição do cofator BH₄, atualmente não financiada pela rede pública, que poderá futuramente ser disponibilizada mediante estudo molecular prévio.

REFERÊNCIAS

- Carvalho TM. Resultados do levantamento epidemiológico da Sociedade Brasileira de Triagem Neonatal (SBTN). Rev Med Minas Gerais. 2003;13:S1 09-35.
- Vilarinho L, Queirós A, Leandro P, et al. Fenilcetonúria Revisitada. ArquiMed. 2006;20:161-72.
- Stranieri I, Takano AO. Avaliação do Serviço de Referência em Triagem Neonatal para hipotireoidismo congênito e fenilcetonúria no Estado de Mato Grosso, Brasil. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009;53:446-52.
- Brasil. Ministério da Saúde. INDICADORES DO PROGRAMA NACIONAL DE TRIAGEM NEONATAL. [Acesso em 27 de novembro de 2011]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/INDICADORES_TRIAGEM_NEONATAL.pdf.
- Amorim T, Boa-Sorte N, Leite MEQ, et al. Aspectos clínicos e demográficos da fenilcetonúria no Estado da Bahia. Rev Paul Pediatr. 2011;29:612-7.
- Vaccaro TS. Identificação de mutações no gene da fenilalanina hidroxilase por PCR em tempo real. [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
- Mira NVM, Marquez UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. Rev Saúde Pública. 2000; 34:86-6.
- Monteiro LTB, Cândido LMB. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. Rev Nutr. 2006;19:381-7.
- Karam SM. Avaliação epidemiológica da triagem neonatal para fenilcetonúria no Rio Grande do Sul 1986-2003: Um estudo de Coorte [Dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
- Zurflüh MR et al. Molecular Genetics of Tetrahydrobiopterin-Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. Hum Mutat. 2008;29:167-75.
- Bernegger C, Blau N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: A study of 1919 patients observed from 1988 to 2002. Mol Genet Metab. 2002;77:304-13.
- Lücke T et al. BH4-Sensitive Hyperphenylalaninemia: New Case and Review of Literature. Ped Neurol. 2003;28: 228-30.
- Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase (2011). Disponível em: <http://www.pahdb.mcgill.ca/>. [Acesso em 2011 Nov 10].
- Heredero L. Un Programa de genética en un país en desarrollo: Cuba. Bol Sanit Panam. 1993;115:32-8.
- Saiki RK et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988;239:487-91.
- Acosta AX, Silva WA, Carvalho TM, et al. Mutations of the Phenylalanine Hydroxylase (PAH) Gene in Brazilian Patients with Phenylketonuria. Hum Mutat. 2001;17: 122-30.
- Santana-da-Silva LC, Carvalho TS, Silva FB, et al. Molecular Characterization of phenylketonuria in South Brazil. Mol Genet Metabol. 2003;79:17-24.
- Santos LL, Magalhães MC, Reis AO, et al. Frequencies of phenylalanine hydroxylase mutations I65T, R252W, R261Q, R261X, IVS10nt11, V388M, Y414C, and IVS12nt1 in Minas Gerais, Brazil. Genet Mol Res. 2006;5:16-23.
- 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. 1998;63:71-9.
- Bercovich D, Elimelech A, Zlotogora J, et al. Genotype-phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene. J Hum Genet. 2008;53:407-18.

21. Thompson & Thompson, Nussbaum RL, McInnes RR, Huntington FW. 7^a ed. (Guanabara Koogan) *Genética Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
22. Naoum PC. O DNA das doenças hereditárias. Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP. 2009 Ago. [Acesso 2011 Nov 30]. Disponível em: <http://www.ciencianews.com.br/siteDNA/DNAhereditario.pdf>.
23. Gejão MG, Ferreira AT, Silva GK, et al. Communicative and psycholinguistic abilities in children with phenylketonuria and congenital hypothyroidism. *J Appl Oral Sci*. 2009;17 (sp. issue):69-75.
24. Silva GK, Lamônica DAC. Desempenho de crianças com fenilcetonúria no Teste de Screening de Desenvolvimento Denver II. *Pró-Fono Rev Atual Cient*. 2010;22: 345-50.
25. Giannattasio S et al. Genetic Heterogeneity in Five Italian Regions: Analysis of PAH Mutations and Minihaplotypes. *Hum Hered*. 2001;52:154-9.
26. Perez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the Phenylalanine Hydroxylase Gene in the Spanish Population: Mutation Profile and Association with intragenic Polymorphic Markers. *Am J Hum Genet*. 1997;60:95-102.
27. 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*. 1998; 35: 301-4.
28. Botler J. Avaliação de desempenho do Programa de Triagem Neonatal do estado do Rio de Janeiro. [Tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2010.
29. Mallolas J et al. Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in the populatin resident in Catalonia: genotype-phenotype correlation. *Hum Genet*. 1999;105:468-73.
30. Trefz FK, Scheible D, Götz H, Frauendienst-Egger G. Significance of genotype in tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*. 2008;32:22-6.
31. Cockburn F, Barwell BE, Brenton DP, et al. Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. *Arch Dis Child*. 1993;68:426-7.
32. Ramírez-Farías MCC, Pérez-Andrade QFBME, Ibarra-González MCI, et al. Controversias en la clasificación de las hiperfenilalaninemias. *Acta Pediatr Mex* 2007;28:261-9.
33. Boa Sorte TRSA 2010. Estudo das bases moleculares da fenilcetonúria no Nordeste do Brasil. [Tese]. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz; 2010.
34. Kayaalp E, Treacy E, Waters P, et al. Human Phenylalanine Hydroxylase Mutations And Hyperphenylalaninemia Phenotypes: A Metanalysis of Genotype-Phenotype Correlations. *Am J Hum Genet*. 1997;61:1309-17.
35. Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Sly WS, Childs B, Beaudet AL, Valle D, Kinzler KW, Vogelstein B. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1667-724.