

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**MONITORIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE FENILALANINA EM PACIENTES COM  
FENILCETONÚRIA POR MEIO DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO:  
COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS**

FERNANDA MEDEIROS SEBASTIÃO

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**MONITORIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE FENILALANINA EM PACIENTES COM  
FENILCETONÚRIA POR MEIO DE SANGUE IMPREGNADO EM PAPEL FILTRO:  
COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS**

FERNANDA MEDEIROS SEBASTIÃO

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ida Vanessa Doederlein  
Schwartz

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências  
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina:  
Ciências Médicas

PORTO ALEGRE

2018

#### CIP - Catalogação na Publicação

Medeiros Sebastião, Fernanda  
Monitorização dos Níveis de Fenilalanina em  
Pacientes com Fenilcetonúria por meio de Sangue  
Impregnado em Papel Filtro: Comparação de Dois  
Métodos / Fernanda Medeiros Sebastião. -- 2018.  
51 f.  
Orientadora: Ida Vanessa Doederlein Schwartz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Fenilcetonúria. 2. Sangue Impregnado em Papel  
Filtro. 3. Acompanhamento. I. Vanessa Doederlein  
Schwartz, Ida, orient. II. Título.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, em especial:

A Ida Schwartz, que acreditou em mim e me deu esta oportunidade, obrigado pelo apoio, ensinamentos, estímulos e incentivos para concluir este trabalho.

A todos os membros do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do HCPA: A Maira Burin, pelo constante aprendizado, A Kristiane Michelin, Ana Paula Sholz, Fernanda Bender e Fernanda Bitencourt que sempre me deram força, carinho, amizade e foram meus pilares durante esta jornada, não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim. Adoro vocês!

Ao pessoal da entrada de materiais que me ajudou nas coletas Cléa, Inamara e especialmente ao Juarez a quem agradeço muito por todos os ensinamentos e conselhos diários.

A minha família que é a base de tudo, obrigado por todo amor e carinho que sempre me deram. A pessoa que sou hoje devo a vocês.

Ao Marcelo, pela compreensão e parceria, obrigado por permanecer sempre ao meu lado e ter me dado o maior presente que eu poderia ter: A nossa filha Lívia, que ainda não chegou, mas já é muito amada por todos.

A Deus por renovar a cada momento a minha força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo desta jornada.

## RESUMO

**Introdução:** Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são doenças genéticas causadas pela atividade deficiente de uma ou mais enzimas específicas ou por defeitos no transporte de proteínas. A fenilcetonúria (PKU) é um EIM causado pela atividade deficiente da fenilalanina-hidroxilase (PAH) que é responsável pela conversão de Fenilalanina (Phe) em Tirosina (Tyr). Esta doença pode ser detectada precocemente através da Triagem Neonatal e seu diagnóstico confirmado através da dosagem de aminoácidos por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). O excesso de Phe e o consequente desbalanço de aminoácidos causam efeito tóxico no Sistema Nervoso Central (SNC) e por consequência perda de funções cognitivas e déficit cognitivo. O tratamento atual é feito principalmente através de dieta restrita em Phe, suplementação de aminoácidos essenciais e acompanhamento laboratorial e clínico. É importante lembrar que o diagnóstico e o tratamento precoce podem levar a excelentes resultados na qualidade de vida destes pacientes.

**Objetivo:** O objetivo do presente trabalho foi avaliar dois métodos distintos: um método fluorimétrico desenvolvido *In House* (método A) e o Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (*Neonatal Phenylalanine Kit – Perkin Elmer®*) (método B) para detecção dos níveis de Phe em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF) em pacientes com PKU que estão em acompanhamento no ambulatório do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) e comparar estes resultados com os resultados obtidos por HPLC, o qual é considerado o padrão ouro para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com PKU.

**Metodologia:** Estudo transversal, prospectivo e observacional no qual foi realizada a determinação dos níveis de Phe em amostras de SIPF de pacientes com PKU acompanhados no ambulatório do SGM-HCPA. Os resultados obtidos foram comparados com os níveis de Phe apresentados, na mesma amostra, pelo método de HPLC (padrão ouro). As amostras foram obtidas a partir de sangue total heparinizado. Após a impregnação do sangue total no papel filtro a amostra foi centrifugada e houve a separação do plasma para a análise pelo método de HPLC. O papel filtro ficou secando a temperatura ambiente por no mínimo 4 horas e no

máximo 24 horas. Após secagem total a amostra foi armazenada em saco plástico com sílica em freezer -80°C até o dia da análise.

**Resultados:** Foram analisadas 89 amostras de SIPF de 47 pacientes que são acompanhados no SGM-HCPA. Dos 47 pacientes testados, 20 (42,5%) possuem a forma clássica de PKU, 16 (34,1%) a forma leve da doença e em 11 o fenótipo não está definido. A correlação entre o método *In House* (método A) e o HPLC, e entre o Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B) e o HPLC feita através da correlação de Spearman, o coeficiente angular, interceptação em y e correlação linear foram de 0,990, 1,0365, 3,8125, 0,9873 e 0,974, 1,0795, 31,98 e 0,895 respectivamente. O nível de significância das duas análises foi de  $p < 0,05$ . Todas as amostras analisadas por HPLC que eram alteradas ou normais, também se mostraram da mesma forma com ambos os métodos testados. A análise feita através da razão do diagrama de Bland Altman mostrou que quanto menor o valor do HPLC, maior é a dispersão dos valores nos métodos A e B.

**Conclusões:** Nossos testes sugerem que amostras de SIPF nos métodos A e B são boas alternativas para a monitorização dos níveis de Phe em pacientes com PKU, sendo que o método A apresentou maior concordância em relação ao padrão ouro.

**Palavras chave:** Fenilcetonúria, Hiperfenilalaninemia; Sangue Impregnado em Papel Filtro; Diagnóstico; Acompanhamento.

## ABSTRACT

**Introduction:** Inborn Errors of Metabolism (IEM) are genetic diseases caused by the absence of activity of one or more specific enzymes or by defects in the transport of proteins. Phenylketonuria (PKU) is an IEM caused by the deficiency of the phenylalanine hydroxylase (PAH), enzyme that is responsible for the conversion of Phenylalanine (Phe) into Tyrosine (Tyr). This disease can be detected early through Neonatal Screening and its diagnosis is confirmed through the measurement of amino acids by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The excess of Phe and the consequent amino acid imbalance cause toxic effect on the Central Nervous System (CNS) and consequently loss of cognitive function and cognitive deficit. The current treatment is mainly made through restricted diet in Phe, supplementation of essential amino acids and laboratory and clinical follow-up. It is important to remember that early diagnosis and treatment can lead to excellent results in the quality of life of these patients.

**Objective:** The objective of the present study was to evaluate two different methods: a fluorimetric method developed *In House* (method A) and the commercial Neonatal Phenylalanine Kit (Perkin Elmer®) (method B) for the detection of Phe levels in dried blood spots samples (DBS) in patients with PKU who are being followed up at the ambulatory of the Medical Genetics Service of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (MGS-HCPA) and compare these results with the results obtained by HPLC, which is considered the gold standard for the diagnosis and monitoring of patients with PKU.

**Methodology:** A cross-sectional, prospective and observational study in which the determination of Phe levels in DBS samples of patients with PKU was carried out in the MGS-HCPA outpatient clinic using two different methods: the *In House* (method A) and the commercial Neonatal Phenylalanine Kit (method B). The results obtained were compared with the Phe levels presented by the HPLC method (gold standard). Samples of DBS were obtained from heparinized whole blood. After impregnation of the whole blood on the filter paper the sample was centrifuged and the plasma separated for analysis by the HPLC method. The filter paper was dried at room

temperature for at least 4 hours and at most 24 hours. After complete drying the sample was stored in plastic bag with silica in freezer -80°C until the day of analysis.

**Results:** A total of 89 DBS samples were analyzed from 47 patients who are followed up at GMS-HCPA. The correlation between the *In House* (method A) and HPLC, and between the commercial Neonatal Phenylalanine Kit (method B) and HPLC using Spearman's correlation, slope, y-intercept and linear correlation were 0.990, 1.0365, 3.8125, 0.9873 and 0.974, 1.0795, 31.98 and 0.895 respectively. The level of significance of the two analyzes was  $p < 0.05$ . Of the 47 patients tested, 20 (42.5%) had the classic form of PKU, 16 (34.1%) the mild form of the disease and 11 (23.4%) were not yet genotyped. All samples analyzed by HPLC that were altered or normal, also showed the same way with both methods tested. The analysis done through the ratio of the Bland Altman diagram showed that the lower the HPLC value, the greater the dispersion of the values in methods A and B.

**Conclusions:** Our tests suggest that DBS samples in methods A and B are good alternatives for the monitoring of Phe levels in patients with PKU, and method A showed greater agreement with the gold standard.

**Keywords:** Phenylketonuria, Hyperphenylalaninemia; Dried Blood Spots; Diagnosis; Follow Up.



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Estratégia de busca de referências bibliográficas

Figura 2: Metabolismo da Fenilalanina

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH4 – Tetraidrobiopterina

DL – Doenças Lisossômicas

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

FM – Fórmula Metabólica

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HPA – Hiperfenilalaninemia

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

LNAA – Large Neutral Amino Acids

PAH - Fenilalanina-Hidroxilase

PAL – Fenilalanina Amônia Liase

Phe – Fenilalanina

PKU – Fenilcetonúria

PNTN – Programa Nacional de Triagem Neonatal

SGM – Serviço de Genética Médica

SIPF – Sangue Impregnado em Papel Filtro

SNC – Sistema Nervoso Central

TP – Teste do Pezinho

Tyr – Tirosina

## **SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	13
2.2 HIPERFENILALANINEMIA E FENILCETONÚRIA .....	14
2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	16
2.4 DIAGNÓSTICO.....	17
2.5 TRATAMENTO .....	18
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>4. HIPÓTESES .....</b>	<b>22</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
5.1 OBJETIVO GERAL.....	23
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>24</b>
<b>7. ARTIGO.....</b>	<b>27</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>47</b>
<b>10. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DE PROJETO .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXO 2 - STROBE .....</b>	<b>50</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

A fenilcetonúria (PKU) é uma aminoacidopatia causada pela deficiência da enzima fenilalanina-hidroxilase (PAH), a qual conduz um acúmulo de fenilalanina (Phe) No Brasil, a PKU pode ser detectada através do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) ou Teste do Pezinho (TP) que deve ser feito entre o 3º e o 5º dia de vida. Se o resultado do TP for alterado ele deve ser repetido em nova amostra de sangue pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) que é considerado o Padrão Ouro no diagnóstico de PKU.

O excesso de Phe e seus metabólitos no sangue são tóxicos para o Sistema Nervoso Central (SNC), causando perda da capacidade intelectual e déficit cognitivo se não tratada rapidamente. No caso de confirmação do diagnóstico de PKU, o paciente deve ser encaminhado ao serviço de referência mais próximo para descobrir a etiologia da doença através de análises da deficiência da PAH, defeitos do metabolismo de tetrabiopterina (BH4), análise de mutações, etc. O tratamento atual é feito através de dieta restrita em Phe e acompanhamento clínico com dosagens periódicas de Phe no sangue.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

Esta revisão foi focada no conhecimento de triagem neonatal, aspectos relacionados às manifestações clínicas, o diagnóstico e o tratamento para PKU. Como estratégia de busca as seguintes bases de dados foram incluídas: PubMed, Science Direct, LILACS e banco de teses da CAPES no período de 1995 a 2016. Foram realizadas buscas através dos termos “Phenylketonuria”, “Phenylketonuria and symptoms”, “Phenylketonuria and diagnosis”, “Phenylketonuria and screening” e “Phenylketonuria and treatment” e suas combinações apresentadas na Figura 1.

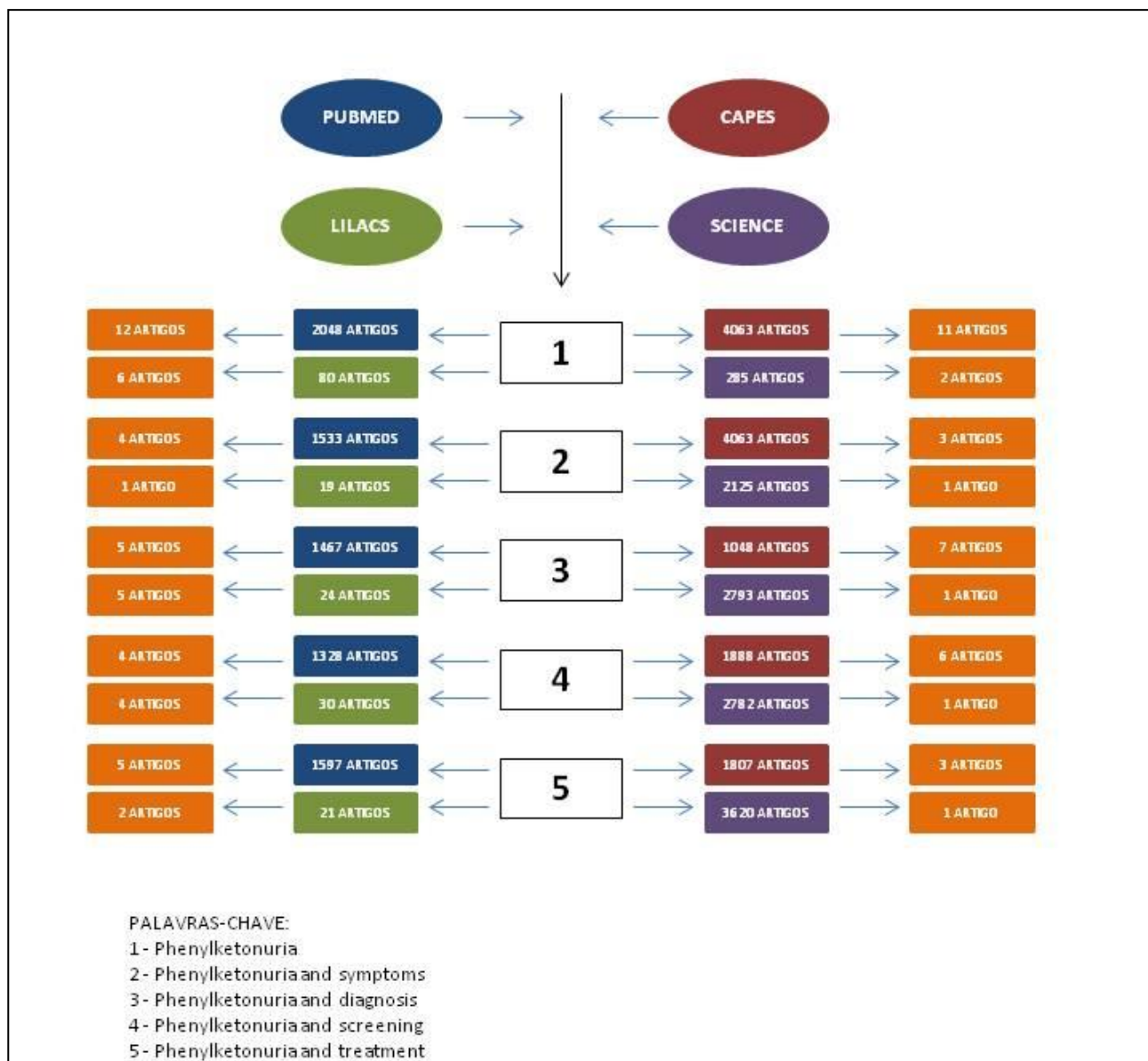


Figura 1 - Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave.

## 2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são doenças metabólicas hereditárias causadas pela falta de atividade de uma ou mais enzimas específicas ou defeitos no transporte de proteínas. As consequências, geralmente, podem ser o acúmulo de substrato da enzima deficiente, a diminuição ou ausência de produtos intermediários ou o desvio do substrato para vias metabólicas alternativas. (AMÂNCIO; SCALCO; COELHO, 2007; ILLSINGER; DAS, 2010; GAMBELLO; LI 2018).

É possível classificar essas doenças metabólicas hereditárias em três grupos, considerando suas características fisiopatológicas e fenótipo clínico: (SAUDUBRAY; GARCIA-CAZORLA, 2018).

Grupo 1 – Defeito no metabolismo intermediário: caracteriza-se pelo comprometimento das vias de metabolização de pequenas moléculas. As principais representantes deste grupo são as doenças como a PKU, a tirosinemia, a homocistinúria, as porfirias e os distúrbios das glicinas e purinas.

Grupo 2 – Defeito na produção / utilização de energia: sintomas que, pelo menos parcialmente, levam a deficiência na produção ou uso de energia no fígado, miocárdio, músculo, cérebro e outros tecidos. Neste grupo estão as doenças de depósito de glicogênio, doenças mitocondriais e defeito da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos.

Grupo 3 – Defeito de síntese ou catabolismo de moléculas complexas: neste grupo os sinais e sintomas são permanentes e progressivos. O grupo inclui as Doenças Lisossômicas (DL), como a doença de Gaucher, a doença de Niemann-Pick, as mucopolissacaridoses e as doenças peroxissomais como a síndrome de Zellweger e a adrenoleucodistrofia.

Os EIM apresentam, geralmente, herança autossômica recessiva, com risco de recorrência de 25% para cada gestação de pais heterozigotos. Atualmente são conhecidos mais de 750 EIM, que individualmente são raros, mas que em conjunto atingem pelo menos 1:800 nascidos vivos (PAMPOLS, 2010; MAK et al., 2013; SAUDUBRAY; GARCIA-CAZORLA, 2018).

## 2.2 HIPERFENILALANINEMIA E FENILCETONÚRIA

A hiperfenilalaninemia (HPA) é o termo que engloba o fenótipo bioquímico caracterizado pelo aumento persistente dos níveis séricos do aminoácido Phe. A HPA é definida como o valor de Phe plasmática maior que 120  $\mu\text{mol/L}$  (2mg/dL) (SCRIVER; KAUFMAN, 2001; PLANA et al., 2006).

A PKU é uma aminoacidopatia causada pela deficiência da enzima PAH, que é responsável pela transformação Phe em tirosina (Tyr) e mais raramente pode ser

causada devido à deficiência de seu cofator tetraidrobiopterina (BH4). (LEHNINGER, 2004; SCRIVER, 2007; BLAU, 2010; BLAU, 2016). (Figura 2)

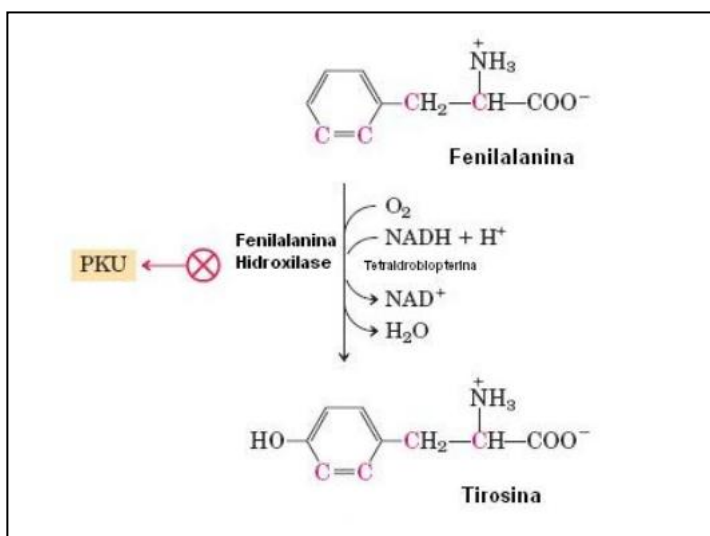


Figura 2 - Metabolismo da fenilalanina e a deficiência de PAH (Adaptado de Lehninger 2004)

Segundo Marsden e Levy (2006) a HPA por deficiência de PAH pode ser dividida em PKU Clássica, PKU Atípica e HPA Não-PKU, sendo que ainda pode ser acrescentada a HPA transitória (MARSDEN; LEVY, 2006).

- PKU Clássica: nível de Phe sanguínea > 1200 µmol/L (> 20mg/dL) em dieta normal.
- PKU Leve: nível de Phe sanguínea entre 360 – 1200 µmol/L (6 – 20mg/dL) em dieta normal.
- HPA Não-PKU: nível de Phe sanguínea entre 120 – 360µmol/L (2 – 6mg/dL) em dieta normal.
- HPA transitória: devido à prematuridade, iatrogenia, doença neonatal do fígado ou hiperfenilalaninemia materna.

Em 1998, Gulberg e colaboradores subdividiram a deficiência de PAH em quatro categorias que se baseia principalmente na tolerância do paciente à Phe:

- PKU Clássica: caracterizada pela deficiência completa ou quase completa da atividade da PAH. Os indivíduos afetados toleram menos que 250 – 350mg

de Phe dietética ao dia, para manter um nível sanguíneo de Phe seguro de não mais de 300  $\mu\text{mol/L}$  (5mg/dL).

- PKU Moderada: os indivíduos afetados toleram 350 – 400mg de Phe dietética ao dia, para manter um nível sanguíneo de Phe seguro de não mais de 300  $\mu\text{mol/L}$  (5mg/dL).
- PKU Leve: os indivíduos afetados toleram 400 – 600mg de Phe dietética ao dia, para manter um nível sanguíneo de Phe seguro de não mais de 300  $\mu\text{mol/L}$  (5mg/dL).
- HPA Leve: os indivíduos afetados tem concentração plasmática de Phe menor que 600  $\mu\text{mol/L}$ (10mg/dL) em dieta normal (GULBERG et al., 1998).

Segundo Blau (2016) a PKU ocupa um lugar único na história do estudo de doenças metabólicas, não só como o EIM dos aminoácidos mais comum, como também a primeira séria condição genética a ser tratada efetivamente (BLAU, 2016).

### 2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Ao nascimento, o paciente com PKU é assintomático. Alguns sintomas podem ser vistos no início da vida dos pacientes tais como, irritabilidade, eczema e odor incomum (este último causado pela excreção excessiva de Phe e seus metabólitos) (MITCHELL; TRAKADIS; SCRIVER, 2011). A manifestação mais importante nesses pacientes é o déficit cognitivo. Na ausência de tratamento o paciente pode perder 50 pontos de QI no primeiro ano de vida. O desenvolvimento somático tende a ser normal, contudo a estatura pode ser menor (NYHAN; OZAND, 1998; BARTUS *et al.*, 2018).

O excesso de Phe e seus metabólitos causam efeito tóxico nas funções somáticas e do SNC interferindo na mielinização e na síntese proteica cerebral, diminuindo a formação de serotonina e alterando a concentração de aminoácidos no liquor, causando a perda de funções como a capacidade intelectual do indivíduo portador. (ACOSTA; YANNICELLI, 2001; MONTEIRO; CÂNDIDO, 2006).



O nível de Phe sanguínea está diretamente relacionado ao grau de retardo e lesão neurológica, que também se correlacionam com a idade que o tratamento foi iniciado. Contudo, pacientes que iniciam o tratamento precoce e adequado podem sofrer algum déficit, especialmente relacionado à atenção e percepção. Através disso percebe-se a necessidade da continuidade do tratamento, durante a vida inteira, de maneira rigorosa (MARTINS *et al.*, 2006).

Mesmo pacientes adultos que não seguem a dieta restrita em Phe podem apresentar sintomas como, depressão, sintomas de ansiedade, agorafobia e dificuldades psicossociais. Até mesmo aumentos transitórios dos níveis de Phe sanguínea podem provocar déficit cognitivo transitório (MARTINS *et al.*, 2006).

## 2.4 DIAGNÓSTICO

Em 1963, Guthrie e Susi publicaram a descrição de um método simples, baseado na concentração de Phe no sangue, para detectar a PKU em recém-nascidos. Mesmo com o passar dos anos esse método e seus derivados são aplicados em todo mundo e modificaram a história natural da doença (SCRIVER; KAUFMAN, 2001; HANNELIUS *et al.*, 2005).

No Brasil a PKU pode ser detectada através do Teste do Pezinho (TP) do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), que foi implantado em 2001 e hoje já é oferecido nos 27 estados. O TP deve ser realizado entre o 3º e o 5º dia de vida, pois para que o aumento de Phe possa ser detectado é fundamental que a criança tenha tido ingestão proteica (BRASIL, 2002).

Uma gota de sangue é coletada do calcanhar do recém-nascido e impregnada em papel filtro e, a partir deste material, é realizado um método de inibição bacteriana da Phe desenvolvido por Guthrie ou a determinação da concentração de Phe. Se o resultado for alterado ele deverá ser repetido. Um segundo teste positivo é acompanhado da análise quantitativa da concentração de Phe e de Tyr no sangue por HPLC que é considerado o padrão ouro, confirmando a HPA. Aumento transitório de Phe pode representar um atraso da maturação de enzimas hepáticas que metabolizam a mesma. Por esse motivo, alguns autores

sugerem que seja realizado o teste de tolerância de Phe da dieta com os pacientes com HPA (NYHAN; OZAND, 1998; SUMAILY; MUJAMAMMI, 2017).

Caso ocorra a confirmação da HPA, o caso deve ser encaminhado para tratamento e investigações adicionais em serviços de referência (MARTINS *et al.*, 2006). Após comprovação do diagnóstico precoce é feito o diagnóstico diferencial onde pode ser visto a etiologia da HPA. As análises poderão diagnosticar, por exemplo, deficiência de PAH e os defeitos do metabolismo de BH4 (PLANA *et al.*, 2006; SUMAILY; MUJAMAMMI, 2017).

## 2.5 TRATAMENTO

Em 1953, Bickel foi o primeiro a divulgar para o mundo que através de uma dieta restrita em Phe, os níveis sanguíneos desse aminoácido diminuem e evita-se o dano neurológico naqueles indivíduos que tem diagnóstico precoce (PLASENCIA; TORRES; TAMAYO, 2009). Desde então, as possibilidades de terapia vêm crescendo e ainda hoje os trabalhos pioneiros de Bickel continuam sendo à base do tratamento da mesma (PLANA *et al.*, 2006). O diagnóstico conjuntamente com início do tratamento precoce leva a excelentes resultados no prognóstico da PKU (HOEKS; HEIJER; JANSSEN, 2009).

A dieta restrita em Phe deve ser iniciada precocemente, idealmente no primeiro mês de vida. Assim os aspectos clínicos indesejáveis da HPA persistente serão evitados. Os resultados são bem menos favoráveis quando o tratamento é iniciado tardiamente (LYON; KOLODNY; PASTORES, 2006).

Como a alimentação dos pacientes com PKU acaba resultando na baixa ingestão de proteínas de alto valor biológico, ela é geralmente complementada com a utilização de uma fórmula metabólica (FM) que contém uma mistura de aminoácidos livres e é isenta de Phe (BUIST *et al.*, 1994 *apud* MIRA, MARQUEZ, 2000; MANTA-VOGLI; SCHULPIS, 2018).

Mesmo que o tratamento com dieta restrita em Phe e o uso da FM seja bem sucedido, a pobre palatabilidade da mesma gera uma baixa adesão ao tratamento,

principalmente por adolescentes e adultos (MITCHELL; SCRIVER, 2011). Devido a isso, algumas terapias estão sendo investigadas, tais como:

- Suplementação de *Large Neutral Amino Acids* (LNAA): que reduz a concentração de Phe no cérebro, mesmo com níveis plasmáticos elevados da mesma, através de competição por esse transportador (MITCHELL; SCRIVER, 2011).
- Administração da enzima fenilalanina amônia liase (PAL): a PAL é uma enzima autocatalítica que não requer um co-fator. Nessa terapia a enzima PAL converte a Phe em quantidades metabolicamente insignificantes de amônia e de ácido trans-cinâmicos, um metabólico inofensivo que posteriormente é convertido em ácido benzóico e rapidamente excretado na urina como ácido hipurato (KARAM *et al.*, 2004).
- Terapia gênica: tem sido explorada em modelos animais demonstrando resultados positivos, porém mais estudos são necessários antes de ensaios clínicos em humanos (MATALON *et. al.*, 2006).
- Suplementação com BH4: a maioria dos pacientes que tiverem formas mais amenas de HPA podem ser sensíveis a BH4, o mesmo melhorando a tolerância à Phe da dieta (MITCHELL; SCRIVER, 2011). *Sapropterin dihidroclorato* (*Kuvan®*, *Biomarn Pharma*) é uma forma sintética oral do BH4. Ensaios clínicos de fase II e III têm demonstrado que o *Kuvan®* é uma terapia segura e eficaz em pacientes com HPA de forma leve a moderada e a alguns pacientes de forma mais graves, aos quais respondem positivamente a testes de sobrecargas com BH4 (BURNETT *et al.*, 2007).

O tratamento dos pacientes com PKU deve ser mantido durante o resto da vida, uma vez que HPA na adolescência tem sido associada com distúrbios de atenção, instabilidade de humor, degeneração da substância branca que leva a convulsões e distúrbios de marcha (BÉLANGER-QUINTANA *et al.*, 2011).

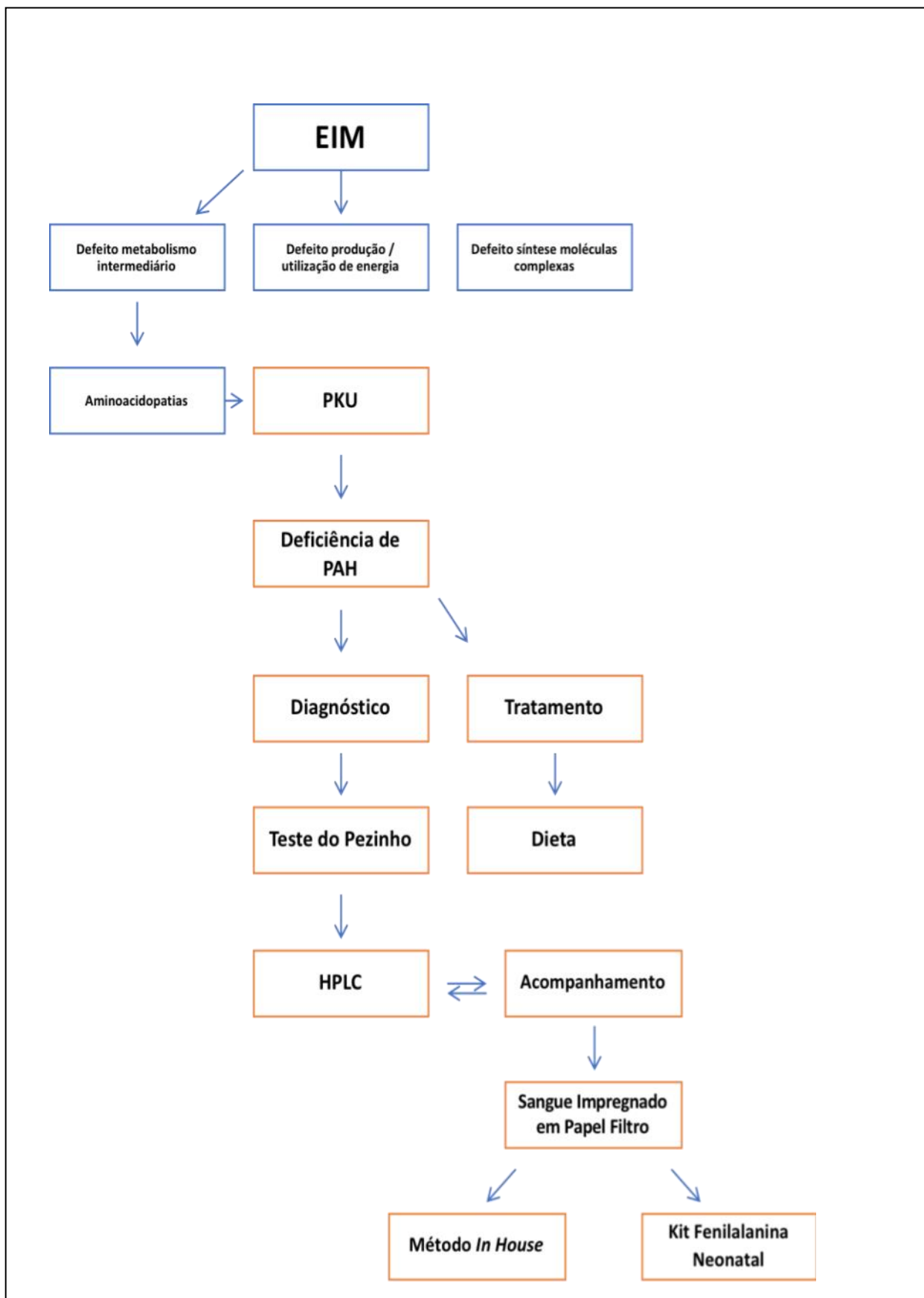


Figura 3 – Marco conceitual da Fenilalanina

### 3. JUSTIFICATIVA

O Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA) é um centro de referência no diagnóstico e tratamento / acompanhamento de pacientes com PKU.

Tendo em vista que os pacientes com PKU necessitam de um controle periódico dos níveis de Phe no sangue para acompanhamento do tratamento e manejo da dieta, e que alguns desses pacientes enviam amostras de sangue ao laboratório uma vez que vivem em partes do estado, e que muitas vezes estas amostras podem se degradar devido à conservação e transporte inadequado do material, este trabalho propõe o controle periódico dos níveis de Phe em amostras de Sangue Impregnado em Papel Filtro (SIPF) através da dosagem fluorimétrica de um método desenvolvido *In House* (método A) ou do Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B), pois a amostra em questão pode ser facilmente obtida com mínima quantidade de sangue, fácil transporte e menor risco de degradação.

#### **4. HIPÓTESES**

Este estudo testará a hipótese de que os métodos testados em SIFP apresentam semelhança ao HPLC, que é o padrão ouro, e podem ser utilizados no acompanhamento dos pacientes com PKU.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Comparar um método desenvolvido *In House* (método A) e o Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B), em amostras de sangue impregnado em papel filtro (SIPF) de pacientes com PKU acompanhados pelo SGM-HCPA, verificando qual dos dois métodos é o mais semelhante ao HPLC e pode ser utilizado no acompanhamento desses pacientes.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os níveis de Phe em amostras de SIPF de pacientes com PKU utilizando o método fluorimétrico desenvolvido *In House* (método A);
- Analisar os níveis de Phe em amostras de SIPF de pacientes com PKU utilizando o Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B);
- Comparar os dois métodos verificando se há concordância dos níveis de Phe encontrados com os níveis de Phe obtidos pela análise com o HPLC.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, P.B., YANNICELLI S. **Ross Metabolic Formula System: Nutrition Support Protocols**, 4th ed. Columbus (OH) p.1-49 Ross Laboratories; 2001.

AMÂNCIO, F. A. M.; SCALCO, F.B.; COELHO, C. A.R. Diagnostic investigation of inborn errors of metabolism in a university hospital. **Brazilian Journal of medical Pathology Laboratory**. v. 43 (3), p. 169-174, 2007.

BARTUS, A et al. The influence of blood phenylalanine levels on neurocognitive function in adult PKU patients. **Metabolic Brain Disease**. v. 33, p. 1609-1615, 2018

BÉLANGER-QUINTANA, A. et al. Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria. **Molecular Genetics and Metabolism**. v.104, p.s19-s25, 2011

BLAU, N. Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria and tetrahydrobiopterin deficiency. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**. v.5 (4), p.483-494, 2010

BLAU, N. Genetics of phenylketonuria: Then and now. **Human Mutation**. v.37 (6), p.508-515, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal**, Brasília – DF, 2002

BURNETT, J.R. Sapropterin dihydrochloride (Kuvan/ Phenoptin), an orally active synthetic form of BH4 for the treatment of phenylketonuria. **IDrugs**, v.10, p.805-13, 2007.

GAMBELLO, M.J.; LI, H. Current strategies for the treatment of inborn errors of metabolism. **Journal of Genetics and Genomics**. v. 45, p.61-70, 2018

GULBERG, 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. **American Journal of Human Genetics** . v. 63, p.71-79, 1998.

HANNELIUS, U. et al. Phenylketonuria screening registry as a resource for population genetic studies. **J. Med. Genet**. v.42, p.1-6, 2005

HOEKS, M. P. A.; Den HEIJER, M.; JANSSEN, M. C. H. Adult issues in phenylketonuria. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 67 (1), p. 2 – 7, 2009.

ILLSINGER, Sabine, DAS Anibh M. Impact of Selected Inborn Errors of Metabolism on Prenatal and Neonatal Development. **IUBMB Life** v. 62 (6), p. 403-413, jun. 2010



KARAM, S.M. et al. **Avaliação epidemiológica da triagem neonatal para fenilcetonúria no Rio Grande do Sul – 1986-2003 : um estudo de coorte.** 125f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Porto Alegre, 2004.

LEHNINGER, A.L. **Principles of Biochemistry.** 4º Edição. New York: Freeman and Company. p.656-689, 2004.

LYON, G.; KOLODNY, E.; PASTORES, G. M. **Neurology of Hereditary Metabolic Diseases of Children**, 3º ed, p. 131 – 134, 2006.

MAK, C.M. et al, Inborn erros of metabolism and expanded newborn screening: review and update. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.** v.50, p.142-162, 2013.

MANTA-VOGLI, P.D.; SCHULPIS, K.H. Phenylketonuria Dietary Management and Emerging Development. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics.** v. 118 (8), p. 1361-1363, 2018

MARSDEN, D.; LEVY, H. L. Classification of PKU. In: BLAU, N.; **PKU and BH4 Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin**, 6º ed., SPS Publications, Heilbronn, 2006.

MARTINS, A. M. et al. **Protocolo Brasileiro de Dietas: erros inatos do metabolismo**, 1º ed., São Paulo, p. 13 – 29, 2006.

MATALON, R. et al. Biopterin responsive phenylketonuria hydroxylase deficiency. **Genetic in Medicine.** v. 6 (1), p. 27-32, 2004.

MIRA, N. V. M.; MARQUEZ, U. M. L. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Revista de Saúde Pública**, v. 34 (1), p. 86 – 96, 2000.

MITCHEL, J.J.; TRAKADIS, Y.J.; SCRIVER, C.R. Phenylalanine hidroxylyase deficiency. **Genetics in Medicine.** v.13 (8), p.697-707, 2011

MONTEIRO, L.T.B; CÂNDIDO, L.M.B. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. **Revista de Nutrição.** v.19 (3), p.381-387, 2006

NYHAN, W.; OZAND, P. Phenylketonuria. In: **Atlas of Metabolic Diseases**, 1º ed., London, p. 109 – 116, 1998.

OLIVEIRA , A. et al. Screening for inborn errors of metabolism among newborns with metabolic disturbance and/or neurological manifestations without determined cause. **Rev Paul Med**, v. 119 (5), p. 160-164, 2001.

PAMPOLS,T. Inherited metabolic rare disease. **Adv. Exp. Med. Biol.** v.686, p.397-431, 2010.

PLANA, J. C. et al. Hiperfenilalaninemia. In: SANJURJO, P.; BALDELLON, A. **Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias**, 2º ed., Majadahonda (Madrid), 2006.

PLASENCIA, L. M. M.; TORRES, A. J. P.; TAMAYO, L. C. **Impacto social del tratamiento integral de la Fenilcetonuria en Cuba**. 2009 [online] Disponível na Internet

via:<http://www.monografias.com/trabajos25/fenilcetonuria/fenilcetonuria.shtml>.

Arquivo capturado em 16 de outubro de 2016.

SAUDUBRAY, J.M., GARCIA-CAZORLA, A. Inborn errors of metabolism overview: pathophysiology, manifestations, evaluation and management. **Pediatric Clinics of North America**. v.65, p. 179-208, 2018.

SCRIVER, C.R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. **Human Mutation**. v. 28(9), p. 831-845, 2007

SCRIVER, C. R.; KAUFMAN, S. Hyperphenylalaninemia hydroxylase deficiency. In: SCRIVER, C. R. et al. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**, 8º ed., New York, p. 1667 – 1724, 2001.

SUMAILY, K.M.; MUJAMAMMI, A.H. Phenylketonuria: A new look at an old topic, advances in laboratory diagnosis and therapeutic strategies. **International Journal of Health Sciences**. v. 11(5), p. 63-70, 2017

## 7. ARTIGO

### MONITORING OF PHENYLALANINE LEVELS IN PATIENTS WITH PHENYLKETONURIA USING DRIED BLOOD SPOTS: A COMPARISON OF TWO METHODS

Fernanda Medeiros Sebastião<sup>a,b</sup>, Maira Graeff Burin<sup>b</sup>, Kristiane Michelin Tirelli<sup>b</sup>, Angela Sitta<sup>b</sup>, Daniella Coelho<sup>b</sup>, Carmen Regla Vargas<sup>b</sup>, Moacir Wajner<sup>b</sup>, Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>a,b,c</sup>

a – Graduate Program in Medical Sciences – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

b – Medical Genetics Service – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

c – Department of Genetics - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Ida Vanessa Doederlein Schwartz

E-mail: [ischwartz@hcpa.edu.br](mailto:ischwartz@hcpa.edu.br)

Medical Genetics Service

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-303 – Porto Alegre – RS – Brazil

Phone: +55 51 33598011

This article will be submitted to *Clinica Chimica Acta*

## Abstract

**Background:** Phenylketonuria (PKU) is caused by deficient activity of phenylalanine hydroxylase (PAH), responsible for the conversion of phenylalanine (Phe) to tyrosine (Tyr). Patients with PKU are monitored by measurement of Phe levels in plasma by high-performance liquid chromatography (HPLC) or in dried blood spots (DBS) by different techniques in order to have their treatment adjusted. The objective of this study was to evaluate Phe levels in DBS measured by two different methods and compare them with the results obtained in plasma by HPLC.

**Methods:** We analyzed 89 blood samples from 47 patients with PKU. Phe levels were measured in the same sample by different methods: in DBS by an In House developed fluorometric method (method A) and by the commercial Neonatal Phenylalanine Kit (PerkinElmer®) (method B), and in plasma by HPLC. Bland-Altman plots were used to assess agreement between the measurement methods. The results were considered to be within the treatment targets if Phe levels were in the range of 120-360  $\mu\text{mol/L}$  for patients <12 years of age and 120-600  $\mu\text{mol/L}$  for patients  $\geq 12$  years of age.

**Results:** The mean Phe levels by method A, method B, and HPLC were  $430.4 \pm 39.9$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $439.3 \pm 35.4$   $\mu\text{mol/L}$ , and  $442.2 \pm 41.6$   $\mu\text{mol/L}$ , respectively. The correlation between HPLC and methods A and B was, respectively, 0.990 and 0.974 ( $p < 0.001$  for both). Bland-Altman analysis showed that the lower the HPLC values, the higher the dispersion of the values of methods A and B, and this dispersion was higher in method B. Regarding treatment targets, in one sample the results by HPLC were not in agreement with the other two methods. In six samples, Phe levels measured by method B were different from those detected by HPLC and method A. In method A, only one sample had Phe levels different from those obtained with HPLC and method B.

**Conclusions:** Our data suggest that methods A and B are useful alternatives for monitoring Phe levels in patients with PKU, with method A being in closer agreement with the reference standard (HPLC).

## 1. INTRODUCTION

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of metabolism caused by deficient activity of the enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH), which is responsible for the hydroxylation of phenylalanine (Phe) to tyrosine (Tyr) [1-3]. Excess levels of Phe have toxic effects on the central nervous system, leading to neurological manifestations such as cognitive impairment [4]. Diagnosis is usually made by neonatal screening, and PKU is most often treated with a Phe-restricted diet, essential amino acid supplementation, and laboratory and clinical follow-up [5]. According to national clinical protocol and therapeutic guidelines for the treatment of PKU (Ordinance No. 1307 of the Brazilian Ministry of Health of November 22, 2013), the recommended target Phe levels are between 120 and 360  $\mu\text{mol/L}$  for patients aged 0-13 years and between 120 and 600  $\mu\text{mol/L}$  for patients aged >13 years, for whom Phe levels up to 900  $\mu\text{mol/L}$  are allowed [6]. However, the complete European guidelines on PKU recommend target Phe levels of 120 to 360  $\mu\text{mol/L}$  for patients <12 years of age and 120 to 600  $\mu\text{mol/L}$  for patients  $\geq 12$  years of age [7]. The guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics, in turn, recommends that Phe levels should be maintained in the range of 120-360  $\mu\text{mol/L}$  in patients of all ages [8]. Nonetheless, Phe levels should be monitored throughout the patient's life as they reflect patient adherence to treatment.

The aim of the present study was to evaluate two different methods for monitoring Phe levels in patients with PKU, an In House developed fluorometric method (method A) and a commercial kit, the Neonatal Phenylalanine Kit from PerkinElmer<sup>®</sup> (method B), both based on the quantitative determination of Phe in dried blood spots (DBS), by comparing their results with those obtained in plasma by high-performance liquid chromatography (HPLC) as the reference standard.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Currently the outpatient clinic of Hospital de Clínicas de Prorto Alegre (HCPA), southern Brazil has around 80 patients with PKU. Based on this number and using Fisher's Z-test for the calculation of the sample size, the sample size required

for our tests was 46 patients. We were able to analyze 89 DBS samples from 47 patients with PKU (mean age 10.8 years) (Table 1).

To obtain DBS samples, heparinized whole blood was spotted on filter paper cards that were dried at room temperature for 4 h. All samples were then placed in plastic bags with silica gel and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The DBS samples were centrifuged, and the plasma obtained was subjected to HPLC analysis.

This study was approved by the local research ethics committee and conducted in accordance with all applicable regulatory requirements.

## **2.1 IN HOUSE FLUOROMETRIC METHOD (method A)**

### **2.1.1 REAGENTS:**

All reagents were prepared with reagent water. Methanol was supplied by JT Baker. Acetone, copper sulfate and sodium carbonate were supplied by Synth. Succinic acid was supplied by Merck. Ninhydrin, L-leucyl-L-alanine and Phe were supplied by Sigma. Sodium potassium tartrate was supplied by Modern Chemistry.

### **2.1.2 CALIBRATION CURVE:**

For the calibration curve, a whole-blood sample was collected and a 10mM Phe standard was prepared. Concentrations of 60, 190, 320 and 670  $\mu\text{mol/L}$  were used, and 30  $\mu\text{L}$  of each standard concentration with whole-blood was pipetted onto each spot of the filter paper card. The filter paper cards with the standards were then dried at room temperature for 4 h, placed in plastic bags with silica gel, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The stability of the standards was tested by different assays. For blank determination, a piece of blank filter paper of 3 mm in diameter (without blood) was used.

### **2.1.3 ASSAY:**

The blank filter paper and 3-mm spots from the DBS samples with the standards were punched, in duplicate, into 96-well V-bottom microplates using a DBS Puncher (1296-071, DELFIA, PerkinElmer<sup>®</sup>). After the addition of 28  $\mu\text{L}$  of protein precipitation solution (3.5 mL of methanol, 3.5 mL of acetone, and 1 mL of water for

injection), the plate was incubated for 30 min at 60°C in a microplate incubator (Trinest Incubator, PerkinElmer®) with shaking at 400 rpm without using a microplate sealer for complete evaporation. Then, 145 µL of water for injection was added and the plate was incubated for an additional 20 min at 60°C covered with a microplate sealer. After incubation, 38 µL of the solution was pipetted and transferred to another black flat-bottom microplate, to which 31 µL of the solution for use (5 mL of 0.2 M succinic acid buffer [pH 5.9], 3 mL of ninhydrin reagent [2.4 µmol], and 1 mL of L-leucyl-L-alanine [0.098 µmol]) was added. The plate was covered with a microplate sealer and incubated for 100 min at 60°C with shaking at 400 rpm. After this phase, the plate was cooled in a freezer for 5 min at -20°C. Subsequently, 195 µL of copper reagent solution for use (2 mL of reagent water and 1 mL of copper reagent stock solution [74 µmol copper sulfate, 5.8 µmol sodium potassium tartrate, and 960 µmol sodium carbonate]) was added, and the plate was agitated for 15 min at room temperature. Fluorescence was measured using a SpectraMax M2 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) with excitation at 390 nm and emission at 486 nm. Concentrations between 200 and 600 µmol/L were diluted 1:3 and concentrations above 600 µmol/L were diluted 1:4 with copper reagent solution to maintain the linearity of the reaction.

## **2.2 NEONATAL PHENYLALANINE KIT (method B)**

The Neonatal Phenylalanine Kit was supplied by PerkinElmer®, and the assay was performed according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured using a SpectraMax M2 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) with excitation at 390 nm and emission at 486 nm. Concentrations between 400 and 600 µmol/L were diluted 1:3 and concentrations above 600 µmol/L were diluted 1:4 with the copper sulfate solution provided in the kit to maintain the linearity of the reaction.

## **2.3 HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

HPLC was performed on a Shimadzu RF-10AXL Fluorescence Detector using heparinized plasma samples. First, deproteinization was performed in 50 µL of plasma by the addition of 200 µL of methanol, followed by centrifugation at 2000 rpm

for 10 min. Then, 40  $\mu\text{L}$  of the deproteinized supernatant was placed in a test tube and 10  $\mu\text{L}$  of internal standard, 50  $\mu\text{L}$  of 4% mercaptoethanol and 200  $\mu\text{L}$  of orthophthaldialdehyde were added. This mixture was vortexed and poured into the apparatus. The total running time for each sample was 1 h.

## 2.4 DATA ANALYSIS

The results obtained with the different measurement methods were considered to be within the treatment targets if Phe levels were in the range of 120-360  $\mu\text{mol/L}$  for patients <12 years of age and 120-600  $\mu\text{mol/L}$  for patients  $\geq$ 12 years of age [7]. Spearman correlation was used to assess the relationship between quantitative variables in the measurement methods. Bland-Altman plots were used to assess agreement between the measurement methods. The slope, y-intercept and linear correlation coefficients were calculated in Excel 2007. Statistical analysis was performed using SPSS, version 18.0. A p-value  $\leq$  0.05 was considered significant for all analyses.

## 3. RESULTS

All samples analyzed by HPLC, whether altered or normal (above or within reference values), showed similar results with the two test methods. All assay results are shown in Table 1.

The mean Phe levels were  $430.4 \pm 39.9$   $\mu\text{mol/L}$  by method A,  $439.3 \pm 35.4$   $\mu\text{mol/L}$  by method B, and  $442.2 \pm 41.6$   $\mu\text{mol/L}$  by HPLC. For the correlation between method A and HPLC, values were 0.990, 1.0365, 3.8125, and 0.9873 according to Spearman, slope, y-intercept, and linear correlation ( $p < 0.001$ ) (Figure 1). For the correlation between method B and HPLC, values were 0.974, 1.0795, 31.98, and 0.895, respectively ( $p < 0.001$ ) (Figure 2).

The samples were divided into three groups according to their concentrations: Group 1, <360.0  $\mu\text{mol/L}$ ; Group 2, >360.0 to 600.0  $\mu\text{mol/L}$ ; and Group 3, > 600.0  $\mu\text{mol/L}$ . Bland-Altman analysis was then performed to measure the level of agreement between the results obtained by the different methods. In method A, as compared with HPLC, the lower the Phe concentration in the sample, the greater the error (Figure 3). The comparison of HPLC with method B showed a much



greater variability between these two methods (Figure 4). Method A had a sensitivity of 97% and a specificity of 100%, while method B had a sensitivity of 96% and a specificity of 80%.

#### **4. DISCUSSION**

The present study showed a strong correlation between Phe levels measured by HPLC in plasma samples and Phe levels measured in DBS samples by an In House developed fluorometric method (method A) and by PerkinElmer<sup>®</sup> Neonatal Phenylalanine Kit (method B), with greater agreement between method A and HPLC than between method B and HPLC.

In many countries, Phe concentrations are measured by tandem mass spectrometry. This technology has a higher analytical sensitivity than fluorometric assays and also has the advantage of analyzing several amino acids at the same time. However, because this technology is expensive, it is not available in most laboratories in low and middle-income countries. This highlights the importance of studies like the present one, since less expensive alternatives should be evaluated and introduced for the appropriate management of patients with PKU worldwide.

Several studies have reported the determination of Phe concentrations in DBS for both screening and follow-up of patients with PKU using methods such as HPLC, ion exchange chromatography, and tandem mass spectrometry [9-12]. However, only a few studies have used fluorometric methods for this purpose.

Tylek-Lemańska et al. [13] compared serum Phe concentrations measured by a fluorometric method with Phe concentrations in DBS samples measured by a colorimetric method to monitor patients with PKU and showed a high correlation between the two methods ( $r=0.970$ ), similar to that found in the present study between HPLC and method B ( $r=0.974$ ) but lower than that between HPLC and method A ( $r=0.990$ ). González et al. [14] developed a fluorometric test for neonatal screening in Cuba and compared it with the PerkinElmer<sup>®</sup> commercial kit used in the present study. Similar to our results, they found a good correlation between the two methods; however, because the test was developed only for neonatal screening, there was no comparison with HPLC as performed in our study. Pecce et al. [15] compared the determination of Phe in serum and DBS samples only by HPLC and showed excellent correlation between the two matrices.

According to the complete European guidelines on PKU, target Phe levels should be between 120 and 360  $\mu\text{mol/L}$  for patients aged <12 years and between 120 and 600  $\mu\text{mol/L}$  for those aged  $\geq 12$  years [7]. Based on these reference values, of 89 samples tested in the present study, 37 (41.6%) were altered as measured by all three methods, which would require dietary management in the patients. As evaluated by HPLC, only one sample (373.8  $\mu\text{mol/L}$ ) would require dietary changes, whereas by method A and method B there would be no change in the diet (355.1 and 325.8  $\mu\text{mol/L}$ , respectively). In method B, three samples were above and three were below the recommended values as compared with HPLC and method A. Other two samples had Phe levels above the desired limits as measured by both HPLC and method A, and only one sample had increased Phe levels as measured by both HPLC and method B.

DBS samples are increasingly used in a wide range of analyses, such as screening, diagnosis, and therapeutic drug monitoring [16-18]. It is important to note that this type of matrix has several advantages, including less invasive collection and need for a minimum amount of blood, which are particularly interesting when dealing with children and newborns and also facilitate transportation of the samples to other facilities, such as reference laboratories [19,20]. Future research should also evaluate Phe levels in healthy individuals in order to establish the sensitivity and specificity of each method in accurately measuring blood Phe levels.

## **5. CONCLUSION**

Phe levels in DBS samples from patients with PKU measured by an in-house developed fluorometric method (method A) and by PerkinElmer<sup>®</sup> Neonatal Phenylalanine Kit (method B) were strongly correlated with plasma Phe levels measured by the gold standard (HPLC). However, approximately 8% of the samples analyzed by method B were not in agreement with the values obtained with HPLC, which may influence the clinical management of patients. Our data suggest that the In House method may be a good candidate to assist in the dietary management of patients with PKU, especially in countries where analyses using expensive technology, such as tandem mass spectrometry, are not always affordable.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Juarez, Cléa and Inamara, staff members of the Medical Genetics Service of HCPA, for their help with patient samples and the Laboratory of Metabolite Analysis for their assistance with HPLC analysis. We are also grateful for the financial support provided by FIPE-HCPA.

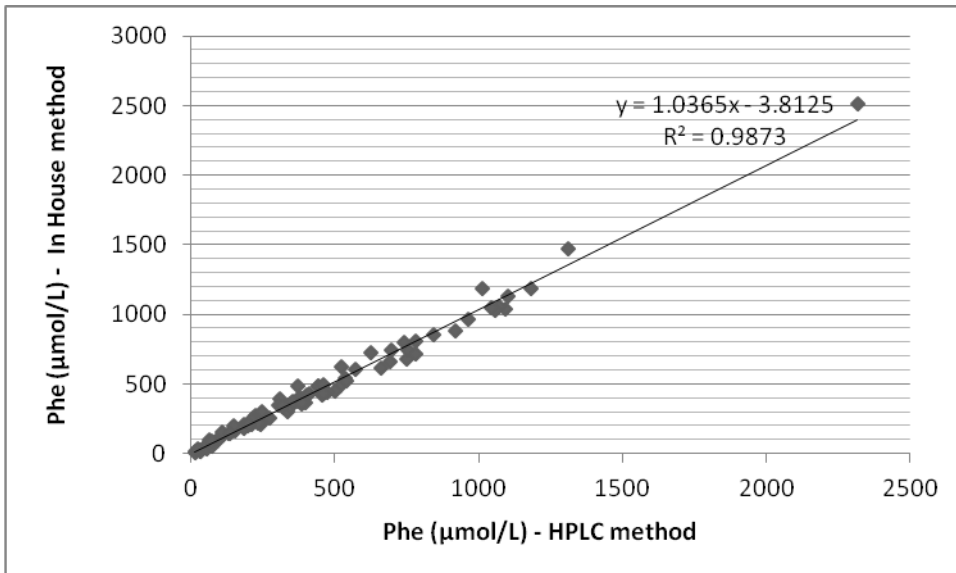


Figure 1 - Correlation between phenylalanine (Phe) concentration in dried blood spots obtained by the In House method (method A) and by high-performance liquid chromatography (HPLC) (n = 89 blood samples).

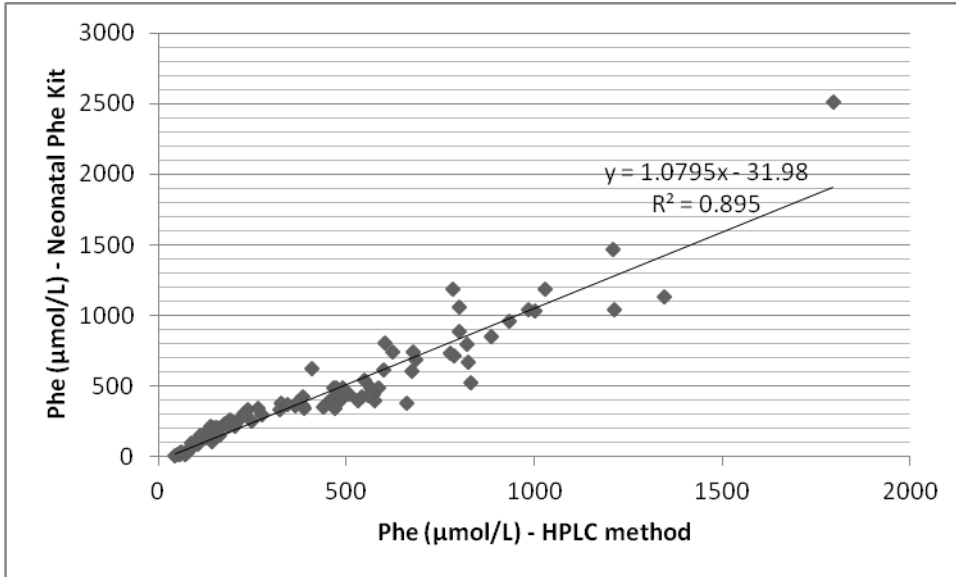


Figure 2 - Correlation between phenylalanine (Phe) concentration in dried blood spots obtained by the Neonatal Phe Kit (method B) and by high-performance liquid chromatography (HPLC) (n = 89 blood samples).

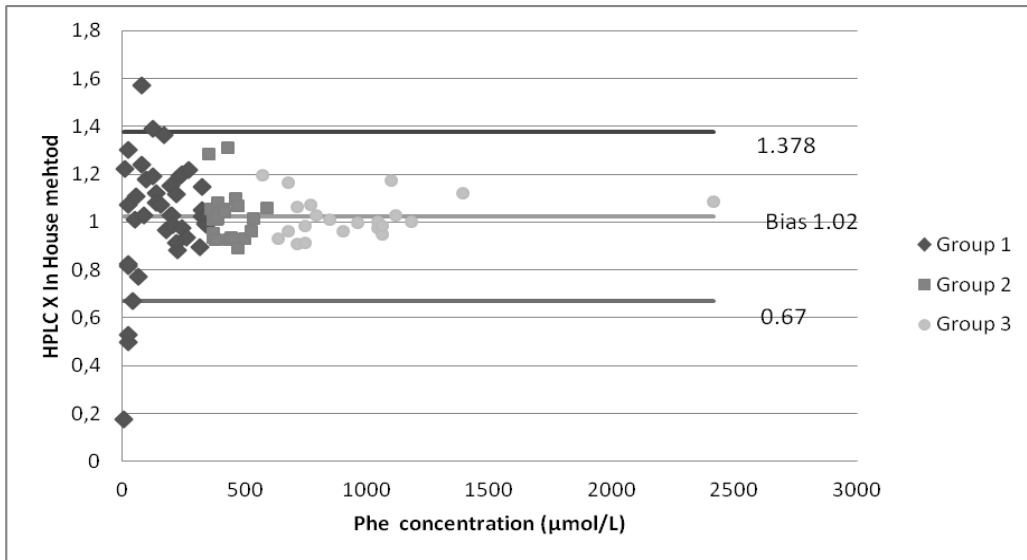


Figure 3 - Ratio of phenylalanine (Phe) concentration in dried blood spots obtained by the In House method (method A) and by high-performance liquid chromatography (HPLC) (n = 89 blood samples). Group 1: <360.0 µmol/L; Group 2 : >360.0 µmol/L <600.0 µmol/L; Group 3: > 600.0 µmol/L

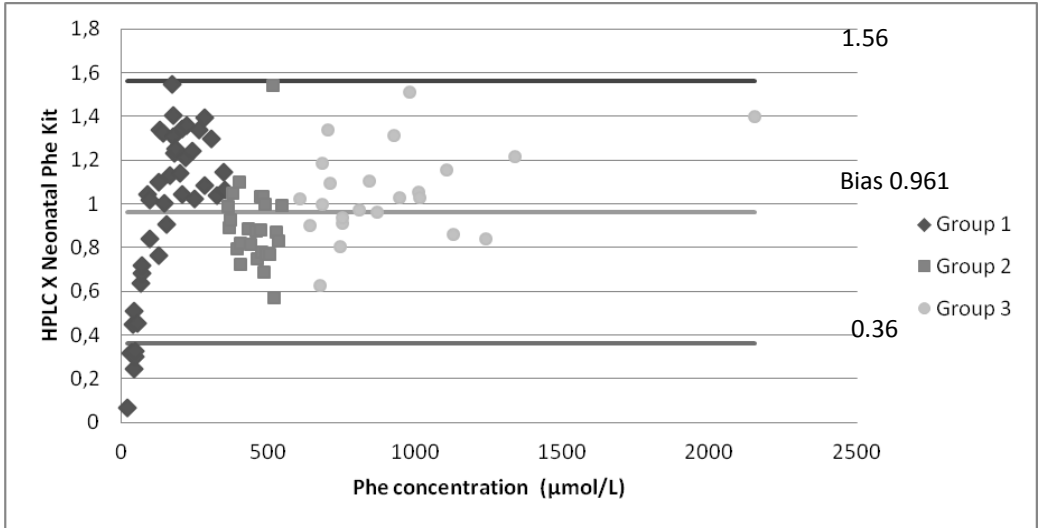


Figure 4 - Ratio of phenylalanine (Phe) concentration in dried blood spots obtained by the Neonatal Phe Kit (method B) and by high-performance liquid chromatography (HPLC) (n = 89 blood samples). ). Group 1: <360.0µmol/L; Group 2 : >360.0 µmol/L <600.0 µmol/L; Group 3: > 600.0 µmol/L

**Table 1 - Sample description and assay results**

Patient	Sample ID	Sex	Age (Months / Years)	PKU Type	HPLC (μmol/L)	Method A (μmol/L)	Method B (μmol/L)
1	1	F	16y	Mild	345.8	349.6	389.0
2	2A	M	3y	Mild	24.2	29.3	73.9
	2B		4y		429.7	458.9	558.3
3	3A	F	5m	ND	212.6	240.4	186.6
	3B		5m		330.2	323.3	237.3
	3C		9m		146.2	130.3	146.0
4	4	M	10y	Mild	683.0	750.2	685.1
5	4A	F	9m	ND	355.7	344.1	<b>384.7*</b>
	5B		1y		627.3	524.4	407.6
	5C		1y		663.9	691.9	824.8
6	6	F	18y	Mild	419.3	453.4	539.7
7	7A	M	3y	Classic	242.2	248.8	200.0
	7B		3y		60.3	54.5	83.9
8	8	M	6y	Mild	109.4	92.8	143.2
9	9A	M	2y	ND	268.9	224	216.7
	9B		3y		52.9	52.4	82.8
10	10A	F	2y	Mild	36.0	53.7	79.1
	10B		2y		201.3	195.5	154.2
	10C		2y		207.6	202.1	166.0
11	11	F	20y	Classic	543.3	535.3	548.2
12	12	M	20y	ND	852.4	844.9	886.0
13	13A	F	5y	Mild	483.9	518.9	584.2
	13B		5y		17.1	34.2	70.5
	13C		5y		345.5	338.7	266.5
	13D		5y		423.4	401.9	384.5
	13E		5y		364.5	382.4	<b>343.0*</b>
14	14	M	22y	ND	1036.3	1092.5	984.8
15	15	M	23y	ND	729.2	626.4	777.0
16	16	M	18y	Classic	520.0	540.8	<b>831.0*</b>
17	17A	M	4y	Classic	18.2	34.5	56.8
	17B		4y		212.4	184.6	137.3
	17C		4y		373.8	<b>355.1*</b>	<b>325.8*</b>
18	18	M	37y	Classic	607.9	<b>573.6*</b>	673.3
19	19A	F	8y	Mild	375.8	371.5	661.0
	19B		8y		394.1	387.8	575.5
	19C		8y		297.3	244.4	273.7
	19D		8y		488.1	443.6	473.2
	19E		8y		236.5	211.8	176.3
	19F		8y		386.8	382.4	368.9
20	20A	F	5y	ND	483.7	442.5	467.6
	20B		5y		199.8	146.6	162.4



Patient	Sample ID	Sex	Age (Months / Years)	PKU Type	HPLC (μmol/L)	Method A (μmol/L)	Method B (μmol/L)
21	21A	F	1m	ND	2512.6	2316.1	1795.1
	21B		1m		883.6	917.7	799.9
	21C		1m		15.5	12.7	48.7
	21D		1m		2.9	16.4	43.7
	21E		1m		93.0	90.6	89.0
	21F		2m		99.4	63.3	97.9
	21G		2m		805.4	782.0	601.3
	21H		2m		208.9	211.8	148.9
	21I		3m		178.2	184.6	157.5
	21J		3m		349.2	304.1	<b>439.4*</b>
	22		22A		F	16y	Classic
22B		17y	959.9	963.0		932.8	
23	23A	M	9m	ND	25.6	23.9	57.3
	23B		9m		162.9	152.1	123.3
	23C		11m		22.4	27.4	74.1
	23D		11m		56.5	73.4	83.0
	23E		1y		88.1	71.0	104.8
24	24	M	19y	Classic	739.6	695.1	624.4
25	25	M	9y	Mild	253.8	271.5	247.6
26	26A	F	10y	Classic	404.8	374.7	458.2
	26B		10y		445.9	499.6	505.9
27	27A	M	6y	Classic	395.5	385.6	484.2
	27B		6y		489.4	373.0	491.4
28	28	F	22y	Mild	302.1	336.7	226.0
29	29	F	18y	Mild	397.0	309.5	532.2
30	30	M	17y	Classic	340.3	342.8	469.8
31	31	M	24y	Mild	740.7	753.1	676.4
32	32A	M	32y	Classic	1182.2	1180.3	782.4
	32B		32y		1045.0	1045.0	1213.3
33	33	F	5y	Classic	360.1	385.6	364.7
34	34	F	25y	Classic	1470.9	1310.6	1208.4
35	35A	F	7y	Classic	213.5	233.5	204.3
	35B		7y		259.0	217.2	190.8
	35C		7y		135.8	114.0	123.8
	35D		7y		333.3	316.8	321.5
36	36A	M	5y	Mild	366.4	396.4	446.6
	36B		5y		490.2	458.9	564.1
37	37	F	20y	Classic	1054.3	1071.6	801.7
38	38	F	65y	Classic	1028.6	1057.2	1002.1
39	39	M	64y	Classic	714.7	782.0	786.3
40	40	F	62y	Classic	613.2	658.9	<b>598.4*</b>
41	41	M	6y	Mild	149.1	107.4	111.5
42	42	F	2y	ND	30.8	23.7	60.3
43	43	F	5y	Classic	440.4	475.2	572.7
44	44	M	21y	Classic	1131.9	1099.8	1345.3

Patient	Sample ID	Sex	Age (Months / Years)	PKU Type	HPLC (µmol/L)	Method A (µmol/L)	Method B (µmol/L)
45	45	M	34y	ND	147.8	136.6	163.1
46	46	F	27y	Mild	797.4	742.9	819.1
47	47	M	31y	Mild	426.7	409.7	488.0

PKU: phenylketonuria; HPLC: high-performance liquid chromatography; F: Female; M: Male; m: month; y: year; ND: not defined. HPLC normal range: <1 month (38-137 µmol/L); >1 month and <2 years (31-75 µmol/L); >2 years and <18 years (26-91 µmol/L); >18 years (42-74 µmol/L). \* Samples that did not agree; European treatment goals: <12 years (120-360 µmol/L); ≥12 years (120-600 µmol/L).

## References

- [1] C.R. Scriver. The PAH Gene . Phenylketonuria . and a Paradigm Shift. *Hum. Mutat.* 28 (2007) 831–845.
- [2] N. Blau. Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria and tetrahydrobiopterin deficiency. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 5 (2010) 483–494.
- [3] N. Blau. Genetics of Phenylketonuria : Then and Now Then : A Brief History of Phenylketonuria. *Hum. Mol. Genet.* 37 (2016) 508–515.
- [4] A. Bartus. F. Palasti. E. Juhasz. E. Kiss. E. Simonova. C. Sumanszki. P. Reismann. The influence of blood phenylalanine levels on neurocognitive function in adult PKU patients. *Metab. Brain Dis.* 33 (2018) 1609–1615.
- [5] C.R. Scriver. S. Kaufman. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency in: Scriver CR. Beaudet AL. Sly WS. Valle D. Childs B. Vogelstein B (Eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th edn. McGraw-Hill. New York; 2001: 1667-1724.
- [6] Brazil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Fenilcetonúria [Internet] Brasília: Ministério da Saúde; 2010. Available from: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt\\_fenilcetonuria.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_fenilcetonuria.pdf)
- [7] A.M.J. Van Wegberg. A. Macdonald. K. Ahring. N. Blau. A.M. Bosch. A. Burlina. The complete European guidelines on phenylketonuria : diagnosis and treatment. *Orphanet J. Rare Dis.* (2017) 1–56.
- [8] J. Vockley. H.C. Andersson. K.M. Antshel. N.E. Braverman. B.K. Burton. D.M. Frazier. J. Mitchell. W.E. Smith. B.H. Thompson. S.A. Berry. A. College. ACMG Practice Guidelines Phenylalanine hydroxylase deficiency : diagnosis and management guideline. *Genet. Med.* (2014) 1–13.
- [9] R. Kand'ár. P. Záková. Determination of phenylalanine and tyrosine in plasma and dried blood samples using HPLC with fluorescence detection. *J. Chromatography.* 877 (2009) 3926–3929.
- [10] H.C.M.T. Prinsen. N.E. Holwerda-loof. M.G.M.D.S. Der Velden. G. Visser. N.M. Verhoeven-duif. Reliable analysis of phenylalanine and tyrosine in a minimal volume of blood. *Clin. Biochem.* 46 (2013) 1272–1275.
- [11] U. Groselj. S. Murko. M. Zerjav. J. Kovac. A. Trampus. B. Repic. T. Battelino. Comparison of tandem mass spectrometry and amino acid analyzer for phenylalanine and tyrosine monitoring — Implications for clinical management of patients with hyperphenylalaninemia. *Clin. Biochem.* 48 (2015) 14–18.

- [12] B.M. Stroup. P.K. Held. P. Williams. M.K. Clayton. S.G. Murali. G.M. Rice. D.M. Ney. Clinical relevance of the discrepancy in phenylalanine concentrations analyzed using tandem mass spectrometry compared with ion-exchange chromatography in phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 6 (2016) 21–26.
- [13] D. Tylek-Lemańska. M. Otarzewski. E. Kostyk. Measurement of phenylalanine in blood on filter paper as a method of monitoring PKU treatment. *J. Med. Screen.* 9 (2002) 64–66.
- [14] E.C. González. A. Frómeta. L. Del Rio. E. Castells. M.S. Robaina. S.M. García. T. Licourt. A.L. Arteaga. L. Martínez. Cuban neonatal screening of phenylketonuria using an ultramicro- fluorometric test. *Clin. Chim. Acta.* 402 (2009) 129–132.
- [15] R. Pecce. E. Scolamiero. L. Ingenito. G. Parenti. M. Ruoppolo. Optimization of an HPLC method for phenylalanine and tyrosine quantization in dried blood spot. *Clin. Biochem.* 46 (2013) 1892–1895.
- [16] M.V. Antunes. M.F. Charão. R. Linden. Dried blood spots analysis with mass spectrometry : Potentials and pitfalls in therapeutic drug monitoring. *Clin. Biochem.* 49 (2016) 1035–1046.
- [17] R. Zakaria. K.J. Allen. J.J. Koplin. P. Roche. R.F. Greaves. Advantages and challenges of dried blood spot analysis by mass spectrometry across the total testing process. *J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab. Med.* 27 (2016) 288–317.
- [18] Y. Enderle. K. Foerster. J. Burhenne. Clinical feasibility of dried blood spots : Analytics. validation . and applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 231–243.
- [19] M.D. Lim, Dried Blood Spots for Global Health Diagnostics and Surveillance : Opportunities and Challenges, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 99 (2018) 256–265.
- [20] X. Su, B.F. Carlson, X. Wang, X. Li, Y. Zhang, J.P. Montgomery, Y. Ding, A.L. Wagner, B. Gillespie, M.L. Boulton, Dried blood spots : An evaluation of utility in the field, *J. Infect. Public Health.* 11 (2018) 373–376.

## 8. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu avaliar dois métodos distintos para a determinação dos níveis de Phe em amostras de SIPF de pacientes com PKU acompanhados pelo SGM-HCPA.

Com relação aos **objetivos específicos**:

- a) Analisar os níveis de Phe em amostras de SIPF de pacientes com PKU utilizando o método fluorimétrico desenvolvido *In House* (método A);
- b) Analisar os níveis de Phe em amostras de SIPF de pacientes com PKU utilizando o Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B);

Através de todos os testes realizados, foi possível analisar e determinar os níveis de Phe em amostras de SIPF de pacientes com PKU utilizando o método fluorimétrico desenvolvido *In House* (método A) e o Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B). A análise de sensibilidade e especificidade do método A foi de 97% e 100% respectivamente, enquanto a sensibilidade e especificidade do método B foi de 96% e 80% respectivamente.

- c) Comparar os dois métodos verificando se há concordância dos níveis de Phe encontrados com os níveis de Phe obtidos pela análise com o HPLC.

Os métodos fluorimétrico *In House* (método A) e o Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B) mostraram uma boa correlação quando comparados com o HPLC (0,990 e 0,974 respectivamente). Das 89 amostras analisadas, sete (7,9%) não concordaram com um ou mais parâmetros:

- Uma amostra estava alterada, em relação aos níveis-alvo, apenas no HPLC (373,8  $\mu\text{mol/L}$ ), e não no método *In House* (método A) ou no Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B) (355,1 e 325,8  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente);
- Três amostras estavam alteradas apenas no Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B);

- Duas amostras estavam alteradas apenas no HPLC e no método *In House* (método A);

- Uma amostra estava alterada apenas no HPLC e no Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B);

Apesar de duas amostras testadas (2.2%) no método *In House* (método A) (355,1  $\mu\text{mol/L}$  e 573,6  $\mu\text{mol/L}$ ) não concordarem com o HPLC (373,8  $\mu\text{mol/L}$  e 607,9  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente), o método *In House* (método A) foi o que melhor representou a realidade metabólica destes pacientes, pois, no Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B), seis amostras (6.7%) das 89 testadas (343,0  $\mu\text{mol/L}$ . 325,8  $\mu\text{mol/L}$ . 598,4  $\mu\text{mol/L}$ . 384,7  $\mu\text{mol/L}$ . 831,0  $\mu\text{mol/L}$  e 439,4  $\mu\text{mol/L}$ ) não concordaram com o HPLC (364,5  $\mu\text{mol/L}$ . 373,8  $\mu\text{mol/L}$ . 613,2  $\mu\text{mol/L}$ . 355,7  $\mu\text{mol/L}$ . 520,0  $\mu\text{mol/L}$  e 349,2  $\mu\text{mol/L}$  respectivamente).

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho conseguimos avaliar dois métodos distintos para serem utilizados no acompanhamento de pacientes com PKU. O método fluorimétrico desenvolvido *In House* (método A) além de apresentar uma melhor correlação com o HPLC que é considerado o padrão ouro, também mostrou melhor sensibilidade e especificidade quando comparado ao Kit comercial de Fenilalanina Neonatal (método B).

O uso do SIPF já faz parte da rotina dos laboratórios do SGM-HCPA tanto para triagem como para o diagnóstico de doenças raras, através de técnicas enzimáticas fluorimétricas e colorimétricas. A implementação de um novo método como o padronizado neste trabalho auxiliará ainda mais o corpo clínico do hospital no manejo do tratamento dos pacientes com PKU, além de facilitar o envio de amostras para centros de referência.

## 10. PERSPECTIVAS FUTURAS

É importante lembrar que estudos com indivíduos hígidos, análises de interferentes como hematócrito, uso ou não de heparina ou outro anti-coagulante, testes de estabilidade de temperatura e coletas capilares devem ser feitos para estabelecer valores de referência e para que possamos conhecer todas as possíveis limitações do método.

Enfim, futuramente, esperamos poder acompanhar os pacientes com PKU através do método desenvolvido *In House* além de adaptar outras técnicas para acompanhamento de pacientes com outras aminoacidopatias como Tirosinemia e Doença da Urina do Xarope do Bordo.



## ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DE PROJETO



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

### CARTA DE APROVAÇÃO

**Projeto:** 170499

**Data da Versão do Projeto:** 13/03/2018

**Pesquisadores:**

IDA VANESSA DOEDERLEIN SCHWARTZ

MAIRA GRAEFF BURIN

MOACIR WAJNER

ROBERTO GIUGLIANI

ANGELA SITTA

CARMEN REGLA VARGAS

FERNANDA MEDEIROS SEBASTIÃO

DANIELLA DE MOURA COELHO

KRISTIANE MICHELIN TIRELLI

**Título:** Validação do Neonatal Phenylalanine Kit e um método fluorimétrico para o acompanhamento de pacientes com Fenilcetonúria

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

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

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

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

Porto Alegre, 09 de abril de 2018.

Prof. Patricia Ashton Prolla  
Coordenadora GPPG/HCPA

## ANEXO 2 - STROBE

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies*

	Item No	Recommendation	On page
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	1-7
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	1-7
<b>Introduction</b>			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	11-19
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	22
<b>Methods</b>			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	28-29
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	28-29
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	28-29
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	28-29
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	29-31
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	29-31
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	28-29
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	28-29
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	28-29
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	28-29
		(c) Explain how missing data were addressed	28-29
		(d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	28-29

		(e) Describe any sensitivity analyses	28-29
<b>Results</b>			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	31
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	
		(c) Consider use of a flow diagram	
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	31
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures	31
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	31
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	
<b>Discussion</b>			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	31-33
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	31-33
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	31-33
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	31-33
<b>Other information</b>			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	33

