

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**HIPERFENILALANINEMIA POR DEFICIÊNCIA DE
FENILALANINA HIDROXILASE: IDENTIFICAÇÃO
DE INDIVÍDUOS RESPONSIVOS À
ADMINISTRAÇÃO DE TETRAHIDROBIOPTERINA
POR VIA ORAL**

LUCIANA GIUGLIANI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E
DO ADOLESCENTE

**HIPERFENILALANINEMIA POR DEFICIÊNCIA DE
FENILALANINA HIDROXILASE: IDENTIFICAÇÃO DE
INDIVÍDUOS RESPONSIVOS À ADMINISTRAÇÃO DE
TETRAHIDROBIOPTERINA POR VIA ORAL**

LUCIANA GIUGLIANI

**Orientador: Roberto Giugliani
Co-orientadora: Ida Vanessa Doederlein Schwartz**

**A apresentação dessa dissertação
é exigência do Programa de Pós-
Graduação na Saúde da Criança e
do Adolescente da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul para
obtenção do título de Mestre.**

Porto Alegre, Brasil

2009

G537h Giugliani, Luciana

Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase: identificação de indivíduos responsivos à administração de tetrahydrobiopterina por via oral / Luciana Giugliani ; orient. Roberto Giugliani ; co-orient. Ida Vanessa Doederlein Schwartz. – 2009.

148 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Fenilcetonúrias 2. Terapia 3. Fenilalanina hidroxilase 4. Biopterina I. Giugliani, Roberto II. Schwartz, Ida Vanessa Doederlein III. Título.

NLM: WD 205.5.A5

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO

ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

25 / 02 / 2010

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Clovis Milton Duval Wannmacher

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Cristina Brinckmann Oliveira Netto

Hospital de Clínicas de Porto

Prof^a. Dra. Themis Reverbel Da Silveira

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Eduardo e Maria Cristina**,
pelo amor e apoio incondicional
em todos os dias da minha vida.

Ao meu irmão **Bruno**, pelo apoio,
afeto e o constante incentivo para realizar
todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Profa. Ida Vanessa Doerdelein Schwartz e Prof. Roberto Giugliani, pela confiança, incentivo, oportunidades proporcionadas, dedicação e amizade.

A equipe do ambulatório de tratamento de distúrbios metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Carolina Fischinger Moura de Souza, Cristina Brinckmann Netto, Lilia Farret Refosco, Tatiele Nalin, Tatiane Alves Vieira e pela amizade, ajuda e disponibilidade em todos os momentos.

A meus pais e meu irmão, pela compreensão, carinho, incentivo e por sempre terem acreditado nos meus sonhos e em mim.

A minha família, pela torcida e apoio durante essa etapa.

Aos meus amigos pela compreensão da minha ausência, mas a acima de tudo, pelo incentivo e torcida.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela oportunidade e a todos que contribuíram para a realização desse estudo, em especial a Silvani Herber, Fernanda Vianna e Cláudio Dacier Lobato, os quais conheci ao longo dessa minha trajetória e levarei para sempre no meu coração.

Em especial a uma grande amiga e também colega de profissão, Tatiele Nalin, que sempre esteve disponível para me ajudar, se tornando o braço direito desse trabalho. Obrigada pelo incentivo e incansáveis discussões científicas ao longo desse trabalho.

A todos os pacientes e familiares entrevistados, meus sinceros agradecimentos.

Ao Laboratório *Merck Serono*, pela doação do medicamento Kuvan®, necessário aos testes de sobrecarga.

Ao Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), pelo suporte financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela ajuda financeira concedida ao pesquisador.

A UFRGS, pelo conhecimento proporcionado.

EPIÍGRAFE

“O tempo é um lugar que se precisa aprender a morar.
A distância é algo a saber entender para não sofrer.
A única maneira é entender o momento de cada pessoa no tempo.”

Eduardo Stein

RESUMO

Introdução: A Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase (HPA-PAH) é um erro inato do metabolismo no qual ocorre aumento dos níveis séricos de fenilalanina (Phe). Estudos recentes, realizados em várias populações, demonstraram que pacientes com HPA-PAH podem apresentar redução das concentrações plasmáticas de Phe mediante a administração oral de tetrahydrobiopterina (BH₄).

Objetivo: Identificar em uma amostra de pacientes brasileiros com HPA-PAH aqueles que são responsivos à administração de BH₄ por via oral.

Métodos: Para um paciente ser incluído no estudo, era necessário ter diagnóstico de HPA-PAH e idade igual ou superior a 7 anos, estar em tratamento dietético e apresentar nível de Phe igual ou superior a 6 mg/dL em todas as medidas realizadas no ano anterior à inclusão no estudo. No dia anterior à sobrecarga de BH₄ (Dia 1), os pacientes foram submetidos a três coletas de sangue para mensuração dos níveis de Phe. No Dia 2, os pacientes receberam dose única de 20mg/Kg de BH₄. As coletas de sangue foram, então, realizadas nos pontos de hora: 0, 4 e 8h (Dia 2) e 24h (Dias 3) após a ingestão do medicamento. Os níveis de Phe foram determinados através da espectrometria de massa *in tandem*. Foram utilizados dois critérios para definir a presença de responsividade ao BH₄: **Critério 1:** redução $\geq 30\%$ de Phe após 8h da administração do medicamento; **Critério 2:** redução $\geq 30\%$ de Phe após 24h da administração do medicamento.

Resultados: Dezoito pacientes foram incluídos no estudo, com mediana de idade de 14 anos, sendo 66,7% do sexo masculino. Onze apresentavam a forma clássica da doença e três a forma atípica. Três (forma clássica: 1, forma atípica: 2) e cinco (forma clássica: 2, forma atípica: 2 e forma não-definida: 1) pacientes foram considerados responsivos ao BH₄ conforme critérios 1 e 2, respectivamente. Os níveis de Phe plasmáticos do dia anterior ao teste de sobrecarga não demonstraram variação nos pontos de hora ($p=0,523$). Entretanto, quando comparamos os níveis de Phe nos pontos de hora do dia pré e pós BH₄, encontrou-se variação significativa entre eles ($p=0,006$). A análise da associação genótipo-fenótipo, para os pacientes com dados disponíveis ($n=6$) mostrou que a mesma é multifatorial.

Conclusão: Nossos achados estão de acordo com a literatura, e indicaram que um número considerável de pacientes brasileiros com HPA-PAH poderá ser beneficiado com a administração oral de BH₄.

Palavras-chave: Fenilcetonúria; PKU; Tetrahydrobiopterina (BH₄); Responsividade ao BH₄; Fenilalanina; Chaperonas.

ABSTRACT

Introduction: Hyperphenylalaninemia by phenylalanine hydroxylase deficiency (HPA-PAH) is an inborn error of metabolism in which increased serum levels of phenylalanine (Phe) occur. Recent studies on several populations showed that patients with HPA-PAH can have their serum levels reduced when receiving oral tetrahydrobiopterin (BH₄).

Objective: to identify in a sample of Brazilian HPA-PAH the patients who are responsive to the oral administration of BH₄.

Methods: the following inclusion criteria were used: diagnosis of HPA-PAH, age \geq 7 years, on dietary treatment and Phe levels \geq 6 mg/dL in all tests performed one year prior to the inclusion in this study. On the day before the BH₄ challenge (Day 1) 3 blood samples were obtained to measure Phe levels. Blood samples were also obtained at time points 0, 4, 8 hours (Day 2) and 24 h (Day 3) after the intake of the medication. Phe levels were determined by tandem mass spectrometry. Criteria used to define responsiveness to BH₄ were: Criterion 1: Phe reduction \geq 30% 8 hours after BH₄ administration; Criterion 2: Phe reduction \geq 30% 24 hours after BH₄ administration.

Results: a total of 18 patients with a mean age of 14 years were included in this study; of those, 66.7% were male. Eleven presented the classical form of the disease and 3, the atypical form. Three patients (classical form: 1, atypical form: 2) and 5 (classical form: 2; atypical form: 2; undefined form: 1) were considered responsive to BH₄ according to criteria 1 and 2, respectively. Phe serum levels on the Day 1 did not show any change on the established time point schedule ($p=0.523$). However, when comparing levels of Phe between Days 1 and 2, significant variation was found ($p=0.006$). The phenotype – genotype association analysis of patients with available data ($n=6$) showed that the association is multifactorial.

Conclusion: In accordance with the literature, our findings show that many Brazilian patients with HPA-PAH can benefit from the oral administration of BH₄.

Key words: Phenylketonuria; PKU; tetrahydrobiopterin (BH₄); Responsiveness to BH₄; Phenylalanine; Chaperones.

LISTA DE FIGURAS

CORPO DA DISSERTAÇÃO

Figura 1. Representação Esquemática dos Erros Inatos do Metabolismo.....	17
Figura 2. Classificação de HPA- PAH em três países europeus.....	24
Figura 3. Representação da herança autossômica recessiva.....	26
Figura 4. Sistema de hidroxilação da fenilalanina.....	35
Figura 5. Síntese e regeneração do BH ₄	49
Figura 6. Mutações detectadas em pacientes com HPA-PAH responsivos ao BH ₄	58
Figura 7. Passos utilizados para a seleção da amostra.....	67
Figura 8. Logística do estudo.....	72

ARTIGO EM INGLÊS

Figure 1 Sample selection algorithm used in this study.....	90
--	----

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Figura 1 Algoritmo da seleção da amostra do presente estudo.....	107
---	-----

LISTA DE TABELAS

CORPO DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1. Mutações comuns da PAH e fenótipos associados.....	32
Tabela 2. Incidência de HPA-PAH em diferentes países.....	33
Tabela 3. Níveis alvo de Phe ao tratamento.....	41
Tabela 4. Resumo dos Ensaio Clínicos com Sapropterin dihydrochlorido em pacientes com HPA-PAH.....	52

ARTIGO EM INGLÊS

Table 1 Plasma phenylalanine levels and percentage of reduction after 20mg/Kg of oral BH4 in HPA-PAH seen at the metabolic disorders outpatient clinics of SGM/HCPA.....	91
Table 2 – PKU Type and Responsiveness to BH4 according to criterion 1 and 2: Result of this sample.....	93
Table 3 – Responsiveness to BH4: genotype-phenotype association in a sample of Brazilian patients compared to literature data.....	93

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Tabela 1 Níveis de fenilalanina plasmática e porcentagem de redução após a administração oral de 20 mg/Kg BH4 em pacientes com HPA por deficiência de PAH do ambulatório de tratamento de distúrbios metabólicos do SGM/HCPA.....	108
Tabela 2 Tipo de PKU e Responsividade ao BH4 de acordo com o critério 1 e 2: Resultados da amostra	110
Tabela 3 Responsividade ao BH4: associação genótipo-fenótipo de uma amostra de pacientes brasileiros e comparação com dados da literatura.....	110

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação das Hiperfenilalaninemia.....	23
Quadro 2. Classificação das deficiências de PAH.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

ATDM-SGM/HCPA: Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do

Serviço de Genética Médica/Hospital de Clínicas de Porto Alegre

BH₄: Tetrahidrobiopterina

DHPR: Dihidropteridina Redutase

EIM: Erros Inatos do Metabolismo

FDA: *Food and Drug Administration*

FM: Fórmula Metabólica

GTPCH: GTP ciclohidrolase

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HPA: Hiperfenilalaninemia

HPA-PAH: Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase

NH₂TP: 7,8-dihidroneopterina trifosfato

PAH: Fenilalanina Hidroxilase

PCDH: pterina-4-carbinolamina desidrogenase hidroxilase

Phe: Fenilalanina

Phe/Tyr: Fenilalanina/Tirosina

PKU: Fenilcetonúria

PPH: 6-piruvoil-tetrahidropterina.

PTPS: 6-piruvoil-tetrahidroneopterina

RDA: *Recommended Dietary Allowance*

RN: Recém-nascido

SR: Sepiapterina redutase

Tyr: Tirosina

TS: Teste de Sobrecarga

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	19
2.1.1 Classificação dos EIM.....	21
2.2 HIPERFENILALANINEMIA.....	22
2.2.1 Causas.....	23
2.3 HIPERFENILALANINEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE (HPA-PAH).....	24
2.3.1 Histórico inicial.....	24
2.3.2 Classificação das HPA-PAH.....	25
2.3.3 Aspectos Genéticos.....	27
2.3.4 Mutações Associadas à HPA-PAH.....	30
2.3.5 Associação Genótipo/Fenótipo.....	33
2.3.6 Aspectos Epidemiológicos.....	34
2.3.7 Aspectos Bioquímicos.....	35
2.3.8 Diagnóstico.....	38
2.3.9 Manifestações Clínicas.....	40
2.3.10 Tratamento.....	41
2.3.11 Tratamentos em desenvolvimento.....	47
2.4 TETRAHIDROBIOPTERINA (BH ₄).....	50
2.4.1 Definição.....	50
2.4.2 Tetrahydrobiopterina (BH ₄) na HPA-PAH.....	52
2.4.2.1 Teste de sobrecarga com BH ₄	55
2.4.2.2 Definindo Responsividade ao BH ₄	58
2.4.2.3 Genótipo e Responsividade ao BH ₄	58
2.4.2.4 Perfil Farmacológico do BH ₄	62
3. JUSTIFICATIVA.....	65
4. OBJETIVOS.....	66
4.1 OBJETIVO GERAL.....	66
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	66
5. MÉTODOS.....	67
5.1 DELINEAMENTO.....	67
5.2 POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	67
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	67
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	68
5.5 TAMANHO AMOSTRAL.....	68
5.5.1 Seleção Amostral.....	68
5.6 VARIÁVEIS.....	70
5.6.1 Sócio-demográficas.....	70
5.6.2 Classificação do tipo de HPA-PAH.....	70
5.6.3 Níveis de Phe.....	71
5.6.4 Teste de sobrecarga com BH ₄	71
5.6.5 Responsividade ao BH ₄	74
5.6.6 Consumo de Phe.....	74
5.6.7 Genótipo.....	75
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
5.8 ASPECTOS ÉTICOS.....	76
6. REFERÊNCIAS.....	77

7. ARTIGO EM INGLÊS	87
Introduction	89
Material and Methods	89
Results	91
Discussion.....	97
References	100
8. ARTIGO EM PORTUGUÊS	103
Introdução.....	105
Material e métodos	105
Resultados.....	108
Discussão.....	114
Referências	118
9. CONCLUSÕES	121
10. COMENTÁRIOS FINAIS E PERSPECTIVAS	122
11. APÊNDICES	123
APÊNDICE A - Termo de Consentimento LIVRE E ESCLARECIDO.....	123
APÊNDICE B - Ficha de Registro do Paciente.....	128
APÊNDICE C – Modelo de Inquérito alimentar de 3 dias utilizado no estudo	130
APÊNDICE D – Gráficos dos pacientes em relação aos níveis de Fenilalanina plasmáticas (mg/dL) nos 12 meses anteriores à sua data de inclusão no estudo e da variação de Fenilalanina plasmática (mg/dL) entre o dia pré e pós BH4.....	131

1. INTRODUÇÃO

A Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase (HPA-PAH) é um erro inato do metabolismo (EIM) dos aminoácidos com padrão de herança autossômica recessiva (SCRIVER et al., 1995; COELHO et al., 1997). A incidência em recém-nascidos (RN) pode variar nos diversos países e em suas diferentes regiões (KARAM, 2004). A média global é estimada dentro do intervalo de 1:10.000-20.000 RN na Europa e nos EUA. (BLAU et al., 2009).

O gene da PAH está localizado no locus 12q23.2 (DONLON et al., 2004), no qual já foram descritas mais de 500 mutações. (BLAU et al., 2009). Foi identificado um número pequeno de mutações como mais prevalentes. O grande número de mutações nesse gene, associado ao fato de que, na maioria dos casos, os afetados são heterozigotos compostos, poderia explicar a grande variabilidade clínica das HPA (SCRIVER, 2007).

Do ponto de vista clínico, como níveis elevados de fenilalanina (Phe) são tóxicos ao sistema nervoso central, a HPA-PAH pode ocasionar retardo mental, distúrbios de comportamento, tremores, convulsões e retardo de crescimento, dentre outras manifestações (MARTINS et al., 2006).

O tratamento clássico para essa doença se baseia no emprego de uma dieta com baixo teor de Phe associada ao uso da fórmula metabólica, quando necessário. Com esse tratamento, ocorre normalização dos níveis séricos de Phe e, se instituído precocemente, prevenção das manifestações clínicas associadas e promoção de crescimento adequado dos pacientes (LYON et al., 2006).

Contudo, a dietoterapia é complexa, de longa duração e, como em qualquer doença crônica, depende da disposição do paciente e de seus familiares de seguir as

recomendações médicas e nutricionais prescritas. A adesão ao tratamento torna-se mais difícil principalmente a partir da idade escolar. O abandono ou relaxamento da dieta, na maioria das vezes, está relacionada com as crises de desenvolvimento, próprias da puberdade. Portanto, a baixa adesão ao tratamento é um problema a ser enfrentado no atendimento de adolescentes e adultos, uma vez que a dieta é muito restrita (NYHAN & OZAND, 1998).

Estudos já realizados têm sugerido que pacientes com HPA-PAH podem ter os seus níveis de Phe melhor controlados mediante a administração oral de BH₄ (TREFZ et al., 2009). A partir desses estudos, percebe-se que cerca de 20 a 50% dos pacientes com HPA-PAH apresentam redução $\geq 30\%$ dos níveis de Phe no sangue quando utilizam BH₄. A presença ou ausência de responsividade ao BH₄ usualmente definida como tal (redução de $\geq 30\%$ dos níveis de Phe) parece ser multifatorial, sendo o genótipo um dos seus fatores determinantes (ZURFLUH et al, 2008).

Um dos objetivos da terapia com BH₄ é de substituir a necessidade de dieta restrita em Phe ou de, pelo menos, aumentar a tolerância à mesma, aumentando, conseqüentemente, a adesão ao tratamento. (BLAU et al, 2009).

Nesse sentido, esta dissertação apresenta um estudo intervencional, inédito no Brasil, com o objetivo de identificar indivíduos responsivos à administração de BH₄ por via oral. Esse estudo foi realizado em pacientes com HPA-PAH em tratamento no Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínica de Porto Alegre (ATDM-SGM/HCPA).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Em 1908, Archibald Garrod verificou que irmãos, filhos de pais hígidos e consangüíneos, excretavam altas quantidades de ácido homogentísico e que, com freqüência um ou mais desses irmãos eram afetados. Baseado nas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança autossômico recessivo para essa doença, denominada alcaptonúria. Através de suas observações, o conceito de que algumas doenças ocorrem pela deficiência de uma enzima responsável por uma rota metabólica foi proposto. Com o avanço da tecnologia, muitos pesquisadores têm detectado novas doenças metabólicas hereditárias e erros inatos do metabolismo (EIM) já foram descritos em todas as áreas do metabolismo humano normal (SCRIVER et al., 2001).

Os EIM são distúrbios hereditários causados por uma deficiência parcial ou total de uma proteína, geralmente uma enzima. A deficiência ou ausência da atividade dessa enzima pode resultar no bloqueio de uma via metabólica, tendo com conseqüência o acúmulo de seus substratos e derivados e/ou falta de seu produto, podendo ocasionar alterações no desenvolvimento mental e físico dos indivíduos afetados (SCRIVER & KAUFMAN, 2001).

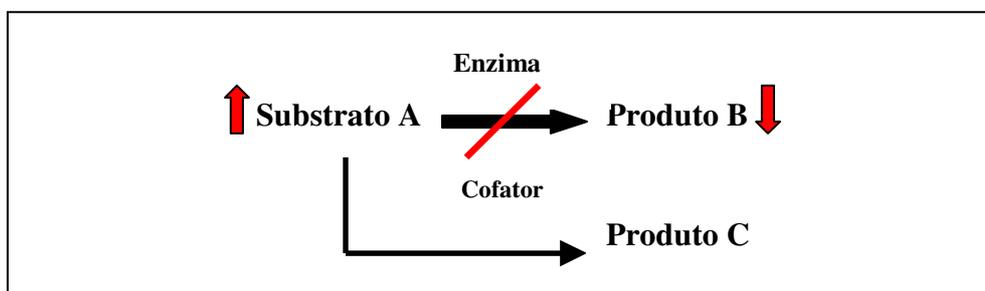


Figura 1. Representação Esquemática dos Erros Inatos do Metabolismo

Fonte: Adaptado de MARTINS et al. (2006)

Os EIM agrupam cerca de 500 doenças hereditárias, quase todas herdadas de modo recessivo (MARTINS et al, 2006). Os EIM ocorrem em todos os grupos étnicos e existem em todos os continentes (SOLIZ et al., 2007)

Individualmente são doenças raras, mas em seu conjunto atingem pelo menos 1:1000 recém nascidos (RN) (OLIVEIRA et al., 2001), sendo muito provável que o número real seja maior. Em grupos de alto risco, como em neonatos agudamente enfermos, com história familiar positiva, esse número pode ser de 10 a 20 vezes maior (KARAM et al., 2001). Entretanto, tudo que se sabe sobre a frequência de EIM pode ser ultrapassado pelas novas informações que emergem com a expansão dos testes de triagem neonatal e com o uso de novas tecnologias de diagnóstico (SOUZA et al., 2002).

Os princípios gerais para o tratamento de um EIM incluem diagnóstico acurado, intervenção precoce e conhecimento da fisiopatologia da doença (SANSEVERINO,1993). O principal objetivo terapêutico dessas condições é restabelecer o equilíbrio metabólico. Para esse fim, podem ser utilizadas diversas estratégias, isoladas ou em combinação: restrição do acúmulo de substrato através da dieta; remoção do acúmulo do substrato por inibição enzimática; rápida remoção do substrato tóxico; estímulo da atividade enzimática residual; estímulos de rotas alternativas; aumento da excreção do substrato; aumento da atividade enzimática (suplementação do cofator, reposição enzimática, terapia de transferência gênica) e controle dos fatores desencadeantes (SOUZA et al., 2002).

2.1.1 Classificação dos EIM

Os EIM podem ser classificados de inúmeras maneiras. Eles foram divididos por Sinclair (1982 citado por Karam et al. 2001) segundo a repercussão celular e metabólica do defeito associado em:

a) *Doenças de transporte*: afetam o transporte renal e/ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas. São freqüentemente desencadeadas pela dieta e conduzem à depleção tecidual e desnutrição. Ocorrem perdas renais a absorção de metabólitos intestinais. Alguns exemplos desse grupo são as deficiências de dissacaridases e defeitos no transporte de magnésio;

b) *Doenças de armazenamento, degradação e secreção*: Em sua maioria, envolvem o aparelho de Golgi ou os lisossomos. Ocorre acúmulo de substratos que são depositados nas células em quantidades anormais, geralmente alterando sua forma e funcionamento. Os metabólitos que são acumulados não estão biologicamente disponíveis. A terapêutica depende da reposição da enzima, do tecido ou do órgão. São exemplos desse grupo as doenças lisossômicas de depósito e as glicogenoses;

c) *Doenças da síntese*: ocorrem quando a síntese de moléculas como hormônios, proteínas plasmáticas e enzimas são incompletas ou anormais. A terapêutica de reposição é freqüentemente eficiente. Pode-se citar como exemplo a hiperplasia adrenal congênita com defeito na síntese do cortisol por deficiência de 21 – hidroxilase;

d) *Doenças do metabolismo intermediário*: São aquelas que geram comprometimento das vias de metabolização de pequenas moléculas. A gravidade e a forma de instalação da doença dependem, em geral, da gravidade da deficiência enzimática e da rota metabólica comprometida. Ocorre geralmente acúmulo de metabólitos tóxicos na

célula, provocando alterações bioquímicas e dano tecidual. Alguns exemplos desse grupo são a tirosinemia, homocistinúria, porfirias, distúrbios do metabolismo das glicinas e das purinas e as hiperfenilalaninemias. Esses distúrbios na maioria das vezes respondem de forma positiva à restrição dietética.

Scriver et al. (2001) classificaram os EIM levando em consideração a área do metabolismo afetada:

- EIM dos aminoácidos;
- EIM dos ácidos orgânicos;
- EIM dos glicídios;
- EIM dos glicosaminoglicanos;
- EIM das glicoproteínas;
- EIM das purinas e pirimidinas;
- EIM das enzimas eritrocitárias;
- EIM dos metais;
- EIM das lipoproteínas;
- EIM dos hormônios;
- EIM das proteínas plasmáticas.

2.2 HIPERFENILALANINEMIA

Hiperfenilalaninemia (HPA) é um termo genérico usado para identificar as concentrações séricas persistentemente elevadas do aminoácido fenilalanina (Phe) (SCRIVER, 2001). A HPA define-se por valor de fenilalanina plasmática maior que 120 $\mu\text{mol/L}$ (2mg/dL) (PLANA et al., 2006; SCRIVER & KAUFMAN, 2001).

2.2.1 Causas

Segundo Smith e Lee (2000), as HPA podem ser causadas pelos fatores abaixo relacionados:

- prematuridade;
- Alto consumo de proteína;
- Insuficiência hepática/renal, incluindo tirosinemia, galactosemia;
- Nutrição parenteral total;
- Relacionada ao uso de alguns fármacos: trimetoprim, agentes quimioterápicos (metotrexate);
- Resposta inflamatória grave;
- Deficiência primária da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH): é a causa mais freqüente, correspondendo a aproximadamente 98% dos casos diagnosticados;
- Defeitos no metabolismo do cofator tetraidrobiopterina (BH₄): correspondem a menos de 2% dos casos de HPA.

2.3 HIPERFENILALANINEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE (HPA-PAH)

2.3.1 Histórico inicial

A HPA-PAH foi descrita há mais de 70 anos pelo médico norueguês Asbjörn Fölling ao observar dois irmãos com retardo mental, que apresentaram reação positiva ao cloreto férrico na urina, decorrente da presença de ácido fenilpirúvico, metabólito da Phe. Em 1937, Penrose e Quastel denominaram essa enfermidade de fenilcetonúria (PKU). Em 1947, Jervis demonstrou que a doença ocorria por bloqueio na hidroxilação da Phe em Tyr; ao administrar Phe em pessoas normais, ocorria aumento da Tyr sangüínea, o que não ocorria nos indivíduos com PKU. Em 1953, Bickel e colaboradores concluíram que uma dieta pobre em Phe iniciada nos primeiros meses de vida poderia prevenir o retardo mental associado à doença. Esse tratamento teve como consequência não só a redução do nível de Phe e o desaparecimento do ácido fenilpirúvico na urina, mas também a melhora no desenvolvimento e do desempenho cognitivo. (PLANA et al., 2006).

Além de ser uma das primeiras doenças neurogenéticas identificadas, a HPA-PAH foi o primeiro EIM tratado com sucesso (ZSCHOCKE & HOFFMANN, 2007).

2.3.2 Classificação das HPA-PAH

Não existe uma padronização em relação à classificação do tipo de HPA-PAH, variando conforme local (BLAU et al., 2009). Existem inúmeras formas de classificar as HPA-PAH. Segundo Marsden e Levy (2006) a HPA-PAH pode ser classificada de acordo com a concentração plasmática da Phe ao diagnóstico, em vigência de dieta normal (Quadro 1).

Quadro1: Classificação das Hiperfenilalaninemias

1) PKU Clássica: nível de fenilalanina sanguínea > 1200 $\mu\text{mol/L}$ (> 20mg/dL) em dieta normal.
2) PKU Atípica: nível de fenilalanina sanguínea entre 360 – 1200 $\mu\text{mol/L}$ (6 – 20mg/dL) em dieta normal.
3) Hiperfenilalaninemia Não – PKU: nível de fenilalanina sanguínea entre 120 – 360 $\mu\text{mol/L}$ (2 – 6mg/dL) em dieta normal.
4) Hiperfenilalaninemia transitória: devido a prematuridade, iatrogenia, doença neonatal do fígado ou hiperfenilalaninemia materna.

Fonte: adaptado de Marsden e Levy (2006)

Outra maneira de classificar as HPA-PAH é baseando-se na atividade residual da enzima. Medidas de atividade da enzima PAH através de biópsia do fígado de pacientes com HPA-PAH apresentaram variações da atividade enzimática residual, variando de aproximadamente 1% da atividade enzimática normal na PKU Clássica até 35% da atividade enzimática normal na HPA Não – PKU (BLAU et al., 2003).

É bom salientar que a classificação entre os tipos de HPA-PAH pode variar de acordo com o país, conforme indica a figura 1.

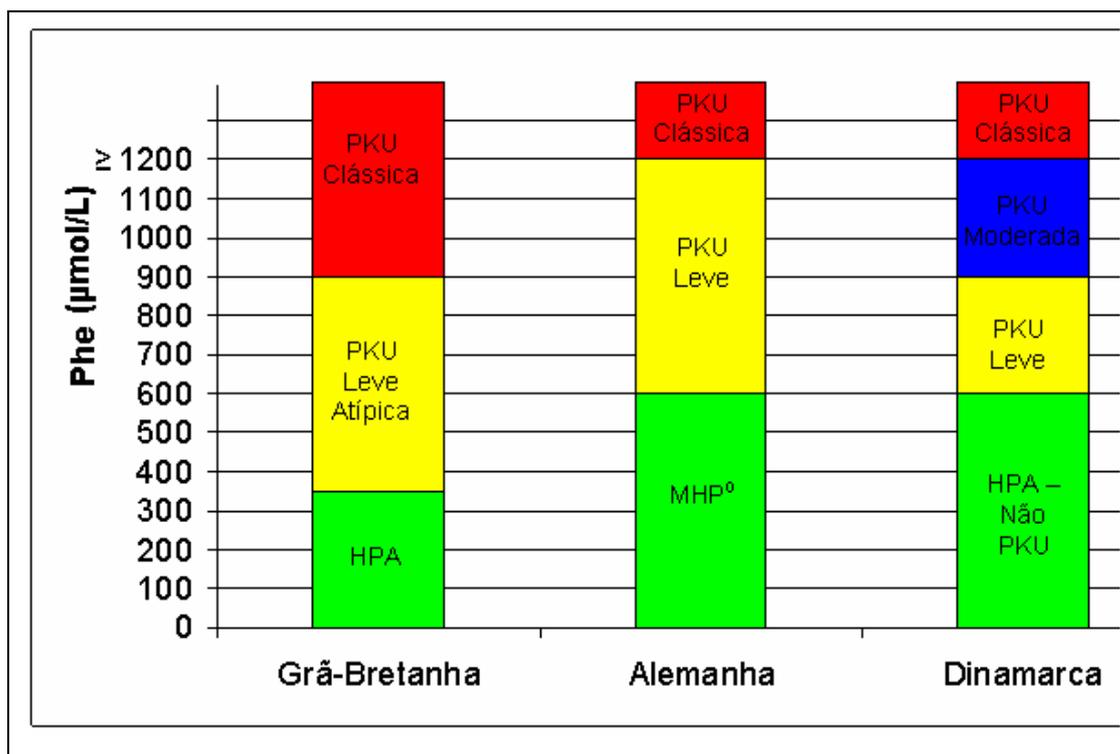


Figura 2: Classificação de HPA-PAH em três países europeus
 ° MHP: Hiperfenilalaninemia Leve

Fonte: adaptado de Lindner (2006)

Mitchell e Scriver (2007), classificaram a HPA-PAH em quatro categorias que se baseiam principalmente na tolerância do paciente à Phe (Quadro 2).

Quadro 2: Classificação das deficiência de PAH

- 1) PKU Clássica: 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) Hiperfenilalaninemia Leve: as crianças afetadas tem concentração plasmática de Phe menor que 600 $\mu\text{mol/L}$ (10mg/dL) em dieta normal.

Fonte: adaptado de Mitchell e Scriver (2007)

A análise do gene da PAH tem sido proposta como um método potencialmente definitivo e não-invasivo para classificação da HPA. Análises de mutações na PAH podem ser realizadas diretamente a partir do DNA extraído do sangue coletado em papel filtro (cartão Guthrie) e o diagnóstico genético poderá, portanto, ser feito imediatamente após o nascimento (MARSDEN & LEVY, 2006). Segundo Guldberd et al (1998), as mutações na PAH são associadas com o fenótipo bioquímico de cada paciente. Os autores sugerem que as análises das mutações nos recém-nascidos com deficiência de PAH poderiam prever o fenótipo e, portanto, poderiam ser utilizadas para determinar a intervenção terapêutica mais adequada como também para fornecer informação para o aconselhamento genético familiar. No entanto, eles também relatam a falta de concordância na associação genótipo/fenótipo em 4% a 23% dos casos e sugerem mais estudos nessa área.

Recentemente, uma categoria adicional, a responsividade desses pacientes ao BH₄, tem sido utilizada para classificar as HPA-PAH. Essa categoria tornou-se aparente em alguns pacientes que não possuem deficiência BH₄ mas que, no entanto, respondem ao tratamento com BH₄. Essa descoberta foi relatada pela primeira vez por Kure et al. no Japão em 1999 e desde então inúmeros trabalhos vêm comprovando esses achados (BLAU, 2009).

2.3.3 Aspectos Genéticos

A HPA-PAH é um EIM dos aminoácidos, com padrão de herança autossômico recessivo. Isso significa um risco de recorrência para a prole de 25% a cada gestação de um casal de heterozigotos (Figura 3). Os heterozigotos representam cerca de 1,5%

da população e não manifestam a doença, pois a presença de um alelo normal permite a síntese de quantidade suficiente da enzima (COELHO et al., 1997; MARZZOCO & TORRES, 1990).

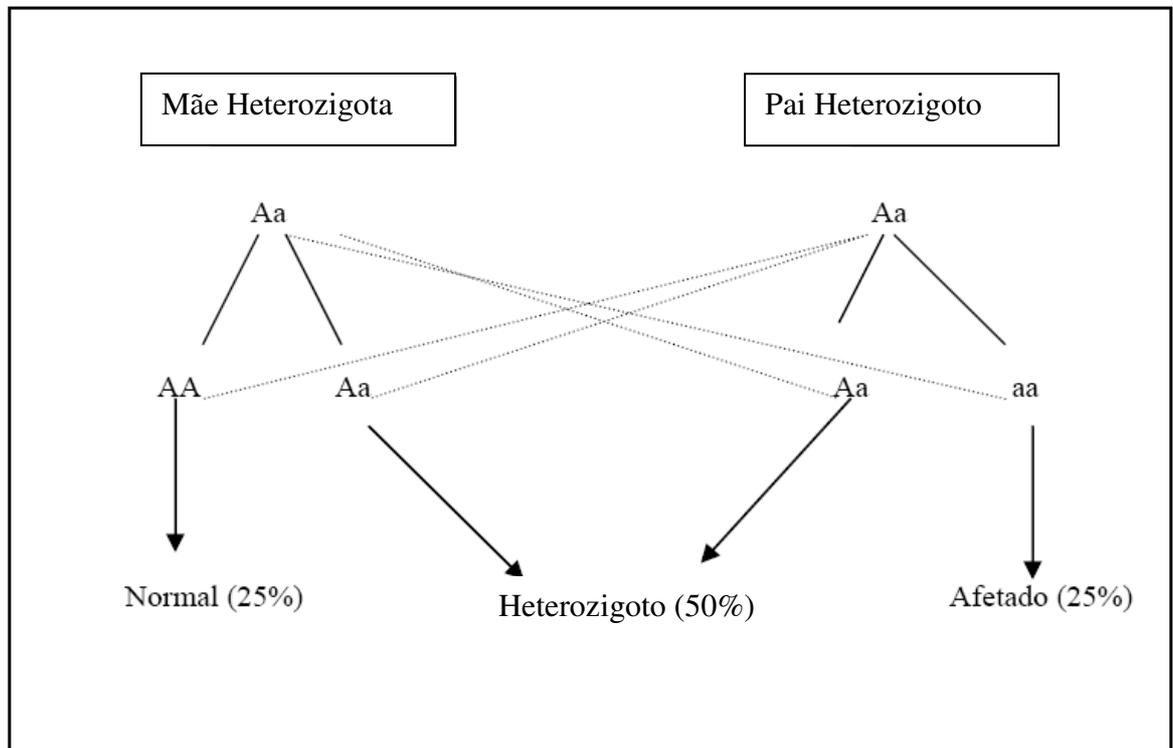


Figura 3. Representação da herança autossômica recessiva

Fonte: Adaptado de Nowacki et al., 1997

O gene da PAH está localizado no locus 12q23.2. Abrange cerca de 90 Kb e contém 13 éxons (DONLON et al., 2004).

O produto normal do gene da PAH é a proteína fenilalanina-4-mono-oxigenase (comumente chamada de PAH). Essa proteína é formada por 452 aminoácidos, apresentando-se na forma tetramérica quando ativa e dimérica quando inativa (HUFTON et al., 1998). Cada monômero de PAH é composto por três domínios: o regulatório, o catalítico e o de tetramerização. O domínio regulatório é formado pelos resíduos 1 ao 142, onde possui uma seqüência interna de auto-regulação. O domínio

catalítico é composto pelo resíduo 143 a 410, onde ocorre a ligação de uma molécula de ferro e de três moléculas de água, formando um centro de ligação ao co-fator natural BH₄. O domínio de tetramerização constitui-se nos resíduos 411 ao 452. Essa região é responsável pela formação de um tetrâmero intacto da PAH, proporcionando um centro de interações com os outros três monômeros (ERLANDSEN et al, 2001).

O gene humano da PAH é rico em marcadores polimórficos, incluindo polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs). Devido a essas características, o gene da PAH possui uma grande variação alélica associados à mutações patogênicas que causam a deficiência enzimática (VACCARO, 2008).

Até 2009 já haviam sido descritas 532 mutações no gene PAH (BLAU et al, 2009). Foi identificado um número pequeno de mutações como mais prevalentes. A grande maioria são raras ou freqüentes em populações específicas (SCRIVER, 2007). Desse modo, a maioria dos casos de HPA-PAH é o resultado de duas mutações diferentes, uma em cada alelo (SCRIVER, 2001).

.Essas mutações podem ser de vários tipos: (WILLIAMS, 2008)

- Mutações de sentido trocado: 62% dos alelos da PAH
- Deleções pequenas ou grandes : 13%
- Mutações em sítio de *Splicing*: 11%
- Mutações silenciosas: 6%
- Mutações sem sentido: 5%
- Inserções: 2%

O grande número de mutações possíveis nesse gene, associado ao fato de que, na maioria dos casos, os afetados são heterozigotos compostos, explica a grande

variabilidade clínica da HPA-PAH. A maioria dos alelos patogênicos apresenta mutações de sentido trocado, causando erro na tradução da proteína PAH (SCRIVER, 2001).

As mutações também podem ser categorizadas de acordo com o impacto na cinética e/ou na estabilidade enzimática. Existe três tipos de mutações: (a) mutações que afetam a estabilidade e a cinética enzimática, (b) mutações que afetam apenas as propriedades cinéticas da enzima e (c) mutações que afetam somente a estabilidade da PAH *in vivo* e *in vitro* (VACCARO, 2008).

Algumas mutações da PAH são mais graves que outras, dependendo do seu efeito na estrutura e na função da enzima. Entretanto, o efeito da mutação da PAH no fenótipo clínico é variável (GIZEWSKA, 2003).

O rendimento e a atividade de determinadas proteínas PAH mutantes podem ser modulados por fatores externos, como a temperatura e o uso de moléculas do tipo chaperonas (GAMEZ et al, 2000). Estudos demonstram que o cofator BH₄ pode ter atividade de uma chaperona natural, estabilizando a enzima mutante, podendo ser, assim, um agente terapêutico em potencial em alguns genótipos da PAH (ERLANDSEN et al, 2004).

2.3.4 Mutações Associadas à HPA-PAH

Ainda não há um quadro bem estruturado das mutações mais frequentes no Brasil, pois apenas um pequeno número de trabalhos foi desenvolvido nesse sentido e uma pequena proporção de pacientes foi estudada. Para determinar a natureza e a frequência das mutações da PAH, no sul do Brasil, foi realizado um estudo em 23 pacientes com HPA-PAH não relacionados dessa região através da análise do DNA

genômico. Como resultado, foram encontrados vinte e duas mutações incluindo p.I65T, a p.R252W, a p.R261X, a p.R261Q, a IVS10-11G>A, a p.V388M, a p.R408W, a IVS12+1G>A e a IVS2+5G>C. Também foi encontrado uma mutação não-patogênica (IVS12+15T>C) (SILVA et al, 2003).

Segundo Vaccaro (2008), seis mutações (IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261X, p.R261Q, p.R408W e IVS12+1G>A) foram identificadas como responsáveis por 63,6% dos alelos mutantes, e serão comentadas brevemente a seguir:

➤ Mutação IVS2+5G>C

É uma mutação grave, uma vez que altera toda a tradução da proteína PAH, ou seja, essa mutação promove uma alteração no *splicing* e conseqüente produção de um mRNA maduro alterado (JENNIANGS et al, 2000). Os pacientes do sul do Brasil possuem uma freqüência de 9,8% dessa mutação (SILVA et al, 2003).

➤ Mutação p.I65T

Essa mutação em genótipo homozigoto ou heterozigoto pode estar associada a qualquer tipo de HPA-PAH (JOHN et al, 1992). Como a mutação localiza-se em uma região de regulação e não de catálise, os fenótipos podem apresentar amplo espectro (ERLANDSEN et al., 2003). Essa mutação foi identificada como a mais freqüente (19,5%) na população do sul do Brasil (SILVA et al., 2003).

➤ Mutação p.R261X

Essa mutação provoca um códon de parada (*stop codon*) e por estar localizada no domínio catalítico, promove uma proteína truncada, com efeito deletério para a enzima, gerando apenas fenótipo de PKU clássica (JENNIANGS et al, 2000). Essa mutação é bastante freqüente na região da Península Ibérica (RIVERA et al., 1998) e

na Itália (DIANZANI et al., 1995), apresentando uma frequência de 9,8% na população do sul do Brasil (SILVA et al., 2003).

➤ Mutação p.R261Q

A mutação está localizada no domínio catalítico da enzima e pode ser encontrada em fenótipos associado a qualquer tipo de HPA-PAH (ERLANDSEN et al., 2003). Estudo relata uma alta frequência dessa mutação na Suíça (EISENSMITH et al, 1992) . Já estudo realizado no sul do Brasil, apresentou frequência de 9,8% (SILVA et al, 2003).

➤ Mutação p.R408W

A mutação está localizada no domínio de tetramerização de proteína e pode ser encontrada em PKU Clássica (DILELLA et al, 1987). Essa mutação contribui com 50% das mutações que ocorrem no leste europeu, sendo a mais frequente em europeus (HOFFEE, 1998; ZSCHOCKE, 2003). No sul do Brasil, essa mutação possui uma frequência de 9,8% (SILVA et al, 2003).

➤ Mutação IVS12+1G>A

Essa mutação gera um defeito de *splicing* no processamento do mRNA, promovendo a síntese de uma proteína truncada. O fenótipo metabólico associado é a da PKU clássica (FUSETTI et al., 1998). É conhecida como a alteração de *splicing* mais prevalente dos alelos de PKU em caucasianos (SCRIVER et al., 2001). É a alteração mais frequente na Dinamarca e na Inglaterra (ZSCHOCKE et al., 1997), além de ser prevalente em diversos países europeus (ZSCHOCKE, 2003). No estudo realizado na população do sul do Brasil apresentou frequência de 4,9% (SILVA et al., 2003).

2.3.5 Associação Genótipo/Fenótipo

Os estudos de mutações são importantes, entre outras razões, pela possibilidade da associação entre mutação e fenótipo. Algumas mutações associam-se a formas graves da doença, como a PKU Clássica, enquanto outras associam-se a formas mais leves da doença, como HPA não – PKU. Assim, conhecendo-se o genótipo do paciente logo após o diagnóstico, poder-se-ia fazer algumas previsões em relação ao seu prognóstico e planejar melhor o seu tratamento (MARTINS et al, 2006).

Güttler e Guldberg (2006) relataram que o tipo de mutação da PAH não é forte preditor do desenvolvimento cognitivo (fenótipo clínico). Contudo, um grande número de estudos têm demonstrado correlação entre o genótipo e a tolerância a Phe (fenótipo bioquímico). Em estudo de Ponzone et al. (2008), envolvendo 21 pacientes com resultado positivo na triagem neonatal para PKU, os pacientes que tiveram duas mutações graves apresentaram fenótipos mais graves, os que tiveram duas mutações leves mostraram fenótipo leve, os que tiveram uma mutação grave e uma leve apresentaram fenótipo moderado ou leve.

Na Europa, Guldberg et al (1998) analisaram as mutações da PAH de 689 pacientes com HPA, através de um estudo multicentrico. As mutações em cada paciente foram correlacionadas com o fenótipo bioquímico dos mesmos. A tabela 1 associa 23 mutações comuns na PAH com os fenótipos correspondentes.

Tabela 1: Mutações comuns da PAH e fenótipos associados

PKU Clássica	PKU Moderada	PKU Leve	HPA Leve
p.R158Q	p.F39L	p.G46S	p.V230I
p.E280K	p.I65T	p.R68S	p.V245A
p.P281L	p.R261Q	p.A104D	p.A300S
IVS10-11G>A	p.L348V	p.E390G	p.T380M
p.R408W	p.V388M	p.R408Q	p.A403V
IVS12+1 G>A		p.Y414C	p.D415N

Fonte: adaptado de Güttler e Guldberg (2006)

2.3.6 Aspectos Epidemiológicos

A HPA-PAH ocorre em todos os grupos étnicos. A incidência em recém-nascidos (RN) pode variar nos diversos países e em suas diferentes regiões (KARAM, 2004), sendo que a média global é estimada dentro do intervalo de 1:10.000-20.000 RN na Europa e nos EUA. (BLAU et al., 2009).

Na Europa Ocidental, a incidência da doença é em média de 1:8.000 RN, apesar de grandes diferenças entre os vários países, conforme tabela 2 (VERKERK et al., 1994).

No Brasil, Schmidt et al (1987) estimaram que, na cidade de São Paulo, 1:12.000 a 1:15.000 RN são portadores de HPA-PAH, com base em levantamento realizado em postos de saúde e berçários. Na região sul do país, Jardim et al (1996) relataram que a razão é de 1:12.500 RN.

Tabela 2 – Incidência de HPA- PAH em diferentes países

País	Incidência	Citação
Países Baixos	1: 18.000	Verkerk et al., 1994
Reino Unido	1: 10.000	Clark, 1992
França	1:17.000	Abadie, 2001
Irlanda	1:4.000	Whitehead, 1996
Canadá	1:22.000	Scriver, 1995
Portugal	1:12.500	Vaz-Osório, 1999
Brasil (Região sul)	1:12.500	Jardim, 1996
Africa	1:132.000	Elsa & Acosta, 2003

2.3.7 Aspectos Bioquímicos

A Phe é um aminoácido essencial e é utilizada principalmente para a síntese de proteína tecidual e hidroxilação para formar Tyr. Apenas 10% da *Recommended Dietary Allowance* (RDA) de Phe é utilizada em adultos normais para síntese de proteínas e um valor próximo de 90% é hidroxilada a Tyr. Nas crianças em crescimento, esses valores correspondem a 60% e 40% respectivamente (ELSAS & ACOSTA, 2003).

Nos seres humanos, a Phe sofre sua metabolização principalmente no fígado, através do sistema da PAH. A hidroxilação da Phe a Tyr requer essencialmente a enzima PAH e o cofator BH₄, que é formado em três etapas a partir de guanosina trifosfato (GTP). Durante a reação de hidroxilação, o BH₄ é convertido a Pterina-4a - carbinolamina que é regenerado através de duas enzimas, umas dessas a

dihidropteridina redutase (DHPR), via q-dihidrobiopterina (qBH₂). O BH₄ também é cofator da tirosina hidroxilase e da triptofano hidroxilase, as quais são importantes na produção de dopamina, catecolaminas, melanina, serotonina e a síntese do óxido nítrico. (Figura 4) (BLAU et al, 2001).

Assim, qualquer defeito que interfira na reação, seja ela um defeito na enzima PAH, ou ainda na biosíntese e/ou reciclagem de BH₄, causará HPA (WALTER et al., 2006).

Quando a hidroxilação para Tyr é impedida, a Phe é acumulada nos sangue e nos tecidos, sendo metabolizada em uma via alternativa. Nessa via, a Phe é transaminada com o piruvato, formando o metabólito fenilpiruvato, o qual é excretado na urina em níveis elevados (SCRIVER & KAUFMAN, 2001).

Além disso, quando o sistema de hidroxilação de Phe é deficiente, ocorre a diminuição da concentração de tirosina, que é responsável pela síntese de melanina, molécula responsável pela pigmentação da pele e cabelos, e catecolaminas que, por sua vez, dão origem a neurotransmissores, como a dopamina e a noradrenalina no sistema nervoso e a adrenalina nas glândulas supra-renais (LEHNINGER, 2004).

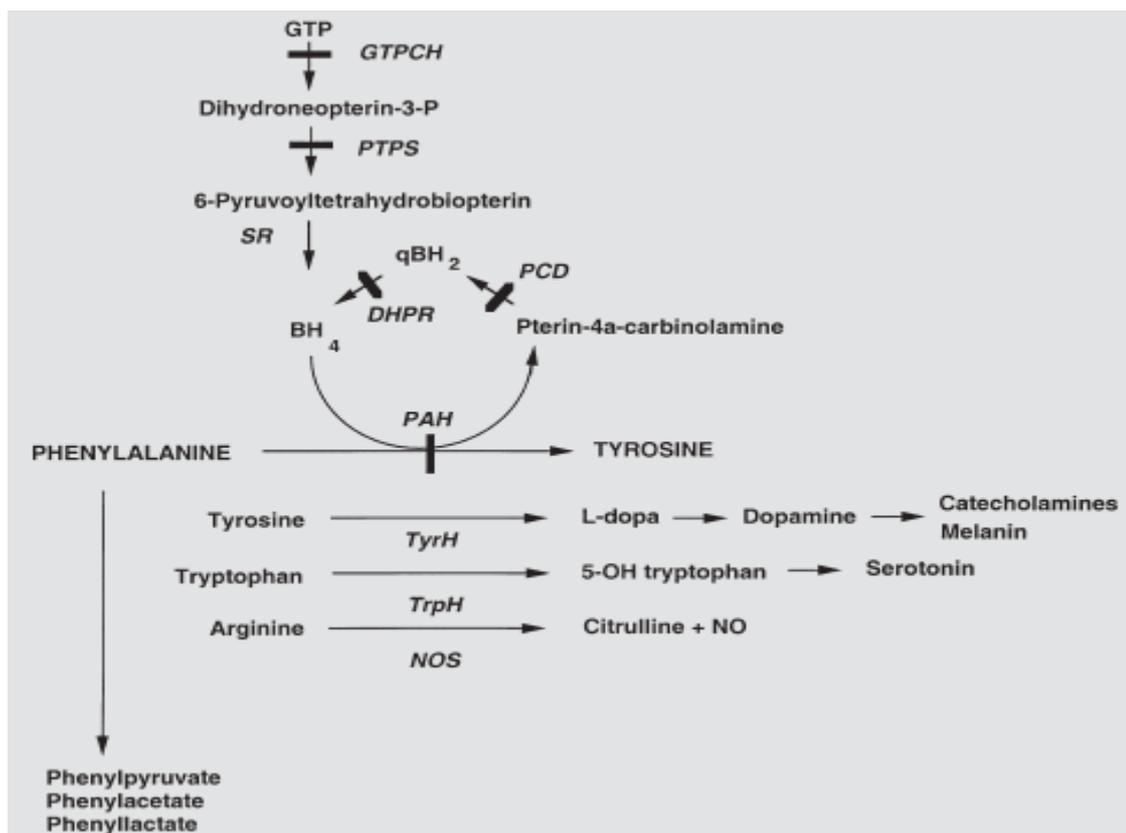


Figura 4: Sistema de Hidroxilação da Fenilalanina. BH₂, dihidrobiopterina; BH₄, tetrahydrobiopterina; DHPR, dihidropteridina redutase; GTP, guanossina trifosfato; GTPCH, guanossina trifosfato ciclohidrolase; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintase; P, fosfato; PAH, fenilalanina hidroxilase; PCD, pterina-4a-carbinolamina desidratase; PTPS, piruvil-tetrahydrobiopterina sintase; SR, sepiapterina redutase; TrpH, triptofano hidroxilase; TyrH, tirosina hidroxilase. Fonte: Walter, Lee e Burgard (2006).

O principal mecanismo de regulação da homeostase da Phe no corpo humano é a atividade catalítica da PAH. Essa atividade é regulada pela concentração de fenilalanina (KAUFMAN, 1999). O papel regulatório da Phe sobre a atividade de PAH pode ser comprovado pela mudança de concentração do cofator BH₄, ou seja, a inibição da PAH é observada na presença de níveis altos das concentrações de BH₄; Por outro lado, em concentrações altas de Phe, a PAH é ativada mesmo com a dosagem alta do cofator (OKANO et al., 2007).

2.3.8 Diagnóstico

Em 1963, Guthrie e Susi publicaram a descrição de um método simples, barato e prático para detectar a HPA em recém-nascidos. O teste de Guthrie (teste semiquantitativo) baseia-se na determinação da concentração de Phe no sangue, através da avaliação da inibição bacteriana (PLANA et al, 2006). Esse método e seus sucessores vêm sendo aplicados em quase todo o mundo e possibilitaram a modificação da história natural da doença (SCRIVER & KAUFMAN, 2001).

A triagem neonatal (“Teste do Pezinho”) para diagnosticar HPA-PAH, permite o tratamento precoce, evitando retardo mental (KARAM et al, 2004). Ela tem sido rotina em toda a América do Norte e no Reino Unido desde meados de 1960 e, na maioria dos demais países desenvolvidos desde os anos de 1970 (SCRIVER, 1998). No Brasil, o médico Benjamin Schmit iniciou em São Paulo em 1976, iniciou o primeiro programa de triagem neonatal, que posteriormente tornou-se prática em outros estados (MARTINS et al., 2006). Em 1990, o Estatuto da Criança e do Adolescente determinou que hospitais e outros estabelecimentos de atenção à saúde façam exames que visem o diagnóstico e terapia de anormalidades no metabolismo do RN, como também a orientação dos pais (BRASIL, 2009a). Em 2001, foi criado e implantado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). A portaria 822 do Ministério da Saúde (MS), de 06 de junho de 2001, estabelece a obrigatoriedade de que hospitais e demais estabelecimentos de saúde que prestem assistência a gestantes, sejam esses públicos ou particulares, realizem exames para diagnóstico de anormalidades metabólicas no recém-nascido, permitindo o desenvolvimento de uma política adequada de controle e avaliação, regulamentando o PNTN (BRASIL, 2009b). Além disso, a portaria número 223, de 22 de junho de 2001, inclui os procedimentos

referentes ao PNTN nas tabelas SIA/SUS e no sistema APAC (Autorização de Procedimento Ambulatorial de Alta Complexidade/Custo) (VARGAS, 2003). A partir de junho de 2002, foi normatizado também o fornecimento dos insumos necessários para o tratamento das patologias detectadas no Programa através de recursos públicos. Dos 27 estados brasileiros, 25 estão habilitados a participar do PNTN (Apenas Roraima e Amapá ainda não estão incluídos) (CARVALHO, 2003). Segundo levantamento realizado pela Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul (RS), em 2005 a cobertura no Estado do Rio Grande do Sul foi de 86% dos recém-nascidos e na cidade de Porto Alegre a cobertura foi de 78,8% dos recém-nascidos (Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul, 2009).

Atualmente, a triagem neonatal pode ser realizada tanto em laboratórios privados quanto em serviços públicos e pode detectar até quatro grupo de doenças, dependendo do estado. No Sul do Brasil, através do Sistema Único de Saúde (SUS), o teste pode detectar PKU, hipotireoidismo congênito e hemoglobinopatias. Já em centros privados o espectro de doenças que podem ser detectados é maior (CARVALHO et al., 2007).

O diagnóstico da HPA-PAH é feito pela detecção de altos níveis sanguíneos de Phe e deve ser realizado preferencialmente no período neonatal. A amostra de sangue para o teste de triagem neonatal é usualmente coletado entre o terceiro e sétimo dia de vida, ou seja, após o início da alimentação com proteínas. Uma gota de sangue é coletada do calcanhar do recém-nascido e aplicada em papel filtro, para a determinação da concentração de Phe. Se o resultado for alterado, ele deverá ser confirmado através da dosagem de Phe em plasma por métodos quantitativos como a análise fluorimétrica, a espectrometria de massa *in tandem* e o método enzimático, os

quais podem ser utilizados para a confirmação e o monitoramento do tratamento (SCRIVER & KAUFMAN, 2001).

Os casos confirmados devem ser encaminhados para tratamento e investigações adicionais em serviços de referência (SOUZA et al, 2002). O diagnóstico diferencial deve ser realizado para confirmar a etiologia da HPA, distinguindo, por exemplo, a deficiência de PAH e os defeitos do metabolismo de BH₄ (PLANA et al., 2006).

É bom salientar que aumento transitório de Phe pode representar um atraso da maturação de enzimas 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-PAH (NYHAN & OZAND, 1998).

O diagnóstico molecular permite identificar os tipos e as frequências das alterações em um determinado gene (VACCARO, 2008). A HPA-PAH é uma doença associada a mutações e haplótipos polimórficos no *locus* da PAH. A análise de mutações pode ser usada para a identificação de heterozigotos, com vistas ao aconselhamento genético e ao diagnóstico provável. Uma ampla variedade de técnicas genéticas moleculares tem sido utilizada, incluindo *Southern blotting*, análise em enzima de restrição, detecção de mutações por sequenciamento, análise de heteroduplex, conformação de polimorfismo de fita simples (SSCP), dentre outros. (WILLIAMS, 2008).

2.3.9 Manifestações Clínicas

Ao nascimento, o paciente com HPA-PAH parece normal. Alguns sintomas podem ser vistos no início da vida dos pacientes como, irritabilidade, inquietação, eczema e odor incomum (SCRIVER et al., 2001). O sintoma mais comum apresentado em

pacientes não tratados é o retardo mental. Na ausência de tratamento, o paciente pode perder 50 pontos de QI no primeiro ano de vida. O desenvolvimento somático tende a ser normal, entretanto a estatura final pode ser reduzida (NYHAN & OZAND, 1998).

Outros sintomas apresentados nesses pacientes são comportamento agitado ou padrão autismo, sinais piramidais, tremores, convulsões, redução da pigmentação do cabelo, pele e íris (como consequência da redução da síntese da melanina) e microcefalia (WALTER et al., 2006). Estudos neuropatológicos realizados com crianças mais velhas com PKU que evoluíram para óbito, mostraram redução do volume do cérebro e perda de fibras de mielina na substância branca (LYON et al., 2006).

Vale ressaltar que pacientes adultos que diminuem a adesão a dieta restrita em Phe podem passar a apresentar algumas manifestações clínicas que incluem dificuldades psicossociais, depressão e sintomas de ansiedade (MARTINS et al, 2006).

Os fenótipos clínicos correlacionam-se com os níveis de Phe no sangue e com a idade que o tratamento foi iniciado, refletindo o grau de deficiência da PAH (WALTER, et al., 2006).

2.3.10 Tratamento

O trabalho pioneiro de Bickel, em 1953 foi o primeiro a demonstrar que, através de uma dieta pobre em Phe, os níveis sanguíneos desse aminoácido diminuem, prevenindo o retardo mental naqueles que tem diagnóstico precoce (PLANA et al., 2006).

O tratamento da PKU se baseia em uma dieta restrita em Phe, visando a manter baixa a concentração plasmática desse aminoácido. A Phe é um aminoácido essencial e, devido a isso, a monitoração de níveis adequados é de extrema importância para as funções biológicas básicas. Em função disso, é necessária a freqüente avaliação quantitativa da concentração da Phe no sangue dos indivíduos com PKU em tratamento (NYHAN & OZAND, 1998; KARAM, 2004).

A dieta restrita em Phe deve ser iniciada precocemente, idealmente no primeiro mês de vida, para que as conseqüências clínicas indesejáveis da HPA sejam evitadas (LYON et al., 2006). Nessa dieta, retiram-se alimentos ricos em proteína de origem vegetal e animal (como, por exemplo, carnes, ovo, leite e derivados), resultando em baixa ingestão de proteínas de alto valor biológico (MIRA & MARQUEZ, 2000). Entretanto, os alimentos que possuem teor médio de Phe podem ser oferecidos na dieta conforme prescrição desse aminoácido. Dentre eles podemos citar a batata, o arroz e massa sem ovo e com farinha de trigo de baixo teor de proteína (MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006 apud NALIN, 2008). É importante ressaltar que o aspartame não deve ser consumido, pois contém 50% de Phe (WALTER et al., 2006).

Como a alimentação dos pacientes com HPA-PAH acaba resultando na baixa ingestão de proteínas de alto valor biológico, ela é geralmente complementada por um alimento medicinal, chamado de fórmula metabólica (FM). Essa fórmula substitui os alimentos ricos em proteínas que são retirados da dieta. Elas são isentas de Phe e fornecem os nutrientes necessários para a suplementação da dieta, contendo uma mistura de aminoácidos livres que provêm 50-90% de equivalentes de proteínas, 90-100% de vitaminas e de elementos-traços e 50-70% de energia. Aproximadamente 75-95% das necessidades protéicas são cobertas por essas fórmulas metabólicas. A prescrição dessa fórmula deve ser individualizada, conforme os níveis alvo de Phe para

cada faixa etária e também confirme tolerância à Phe na dieta (BUIST et al., 1994 apud MIRA & MARQUEZ, 2000). No Brasil, tais fórmulas metabólicas são custeadas pelo Ministério da Saúde e distribuídas pelas secretarias Estaduais de Saúde

Por falta de maiores estudos, os requerimentos protéicos para os pacientes afetados seguem as recomendações propostas pela FAO/WHO, considerando-se a necessidade de ingestão de proteína igual à de indivíduos saudáveis.

Os objetivos do manejo nutricional devem incluir a manutenção das concentrações de Phe plasmática nos valores descritos na tabela 3 (BLAU & BLASKOVICS, 1996). Entretanto, cumpre salientar que essas recomendações variam de país para país, conforme o protocolo local (BLAU et al, 2009).

Tabela 3: Níveis alvo de Phe ao tratamento.

Idade	Phe alvo (mg/dL)
0 – 12 meses	2 – 6
1- 13 anos	2 – 6
> 13 anos	
- permitido	2 – 15
- desejável	2 – 10
- gestação	2 – 6

Fonte: Blau & Blaskovics (1996)

O tratamento é para a vida toda. A dietoterapia é complexa e de longa duração. O sucesso do tratamento a longo prazo, como de qualquer doença crônica, depende da disponibilidade do paciente em seguir as recomendações médicas e nutricionais prescritas. A quantidade de Phe da dieta e da FM é sempre individualizada, e varia de paciente para paciente, conforme sua fase de crescimento pondero-estatural. Devido a isso, o monitoramento do paciente é essencial (NYHAN & OZAND, 1998).

O cardápio do indivíduo com PKU é restrito a alimentos com teor reduzido e conhecido de Phe, e o controle da dieta, que é relativamente fácil nos primeiros anos de vida, pode tornar-se de difícil execução a partir da idade escolar. Geralmente, o abandono ou relaxamento da dieta ocorre na adolescência, quando surgem as crises de desenvolvimento, próprias da puberdade. Diversas razões contribuem para essa descontinuidade, tais como: (a) pressões sociais que dificultam a integração do indivíduo com PKU na sociedade, (b) disponibilidade de tempo para adequar-se à dietoterapia, (c) limitação financeira devido ao elevado custo dos alimentos especiais, (d) independência familiar, (e) desconhecimento dos teores de Phe nos alimentos, (f) falta de conhecimento sobre as implicações da dieta-doença e (g) falta de produtos com teores reduzidos de Phe que possam suprir as necessidades nutricionais (MIRA & MARQUEZ, 2000).

O tratamento requer muitas mudanças de hábitos por parte do paciente e de sua família. É de extrema importância que tanto a família quanto o paciente compreendam perfeitamente as exigências nutricionais, as limitações de certos produtos pelo teor de nutrientes e as conseqüências de não se utilizar as quantidades adequadas (SMITH & LEE, 2000). Os registros alimentares, além de serem utilizados para calcular a ingestão de Phe sanguíneo, podem ser eficazes para verificar a compreensão dos pais sobre a dieta. Se a compreensão estiver errada, será necessária uma educação adicional aos pais. Erros de compreensão mais presentes entre os adolescentes são o número e tamanho das porções permitidas (ELSAS & ACOSTA, 2003).

Os benefícios da dieta com restrição do aminoácido Phe são claros e incluem: prevenção de anormalidades bioquímicas (aumento da concentração de Phe), melhora do desempenho neurológico e psicológico e a prevenção de danos neurológicos. Contudo, o tratamento dietético das HPA-PAH possui certos desafios, tais como, o

cumprimento da dieta, o requerimento do apoio social e risco dos desequilíbrios dos nutrientes dietéticos essenciais (WILLIAMS, 2008).

A monitoração do tratamento restrito em Phe deve ser constante, por meio do controle do consumo dietético e do desenvolvimento neurológico, físico, intelectual e comportamental. Entre os dados utilizados para monitoramento clínico estão: peso, estatura, perímetro cefálico, estado geral de saúde, desenvolvimento neurológico e psicológico, assim como o nível sanguíneo de Phe, que deve ser monitorado semanalmente nos primeiros anos de vida e conforme o paciente envelhece esse intervalo aumenta, chegando a ser de 2 – 3 meses em adolescentes e adultos (WALTER et al., 2006).

Mesmo com o tratamento baseado em uma dieta restrita em Phe juntamente com a suplementação da FM, os pacientes podem apresentar algumas deficiências nutricionais como depleção de selênio, zinco, ferro, cálcio, assim como alterações na biossíntese do colesterol e no perfil dos ácidos graxos (WILLIAMS, 2008).

Além disso, devido à restrição na dieta, deficiências dietéticas podem ocorrer. São descritos baixa concentração de cálcio, osteopenia e aumento do risco de fraturas (WALTER et al., 2006), assim como deficiência de vitamina B₁₂ em adolescentes e adultos com PKU (HANLEY et al., 1996).

Pesquisa realizada por Hillman et al (1996) em 11 crianças HPA por deficiência de PAH mostra um decréscimo da densidade mineral óssea na coluna lombar e extremidades menores, e discute se a menor concentração de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) séricos dessas crianças é devida ao tratamento e processo da doença ou à reduzida biodisponibilidade mineral.

Na Alemanha, Lombeck et al (1996), investigando a quantidade de selênio (Se) em 87 pacientes com PKU, verificaram que os valores de Se e a atividade da glutathiona

peroxidase no plasma e eritrócitos foram bem menores, quando comparados com os de crianças saudáveis. É bom salientar que fontes ricas de Selênio são encontradas nas carnes, frutos do mar, ovos e alguns grãos, que não fazem parte da alimentação desses pacientes devido ao alto teor de Phe.

A vitamina B12 é essencial para o crescimento, havendo maior necessidade durante a adolescência. A sua deficiência se manifesta por anemia megaloblástica e problemas neurológicas. As maiores fontes dessa vitamina são provenientes das carnes, peixe, ovos, leite e derivados. Cereais, legumes e frutas não contêm vitamina B12. Logo, portadores de HPA-PAH têm grande propensão a essa deficiência, devido ao tratamento alimentar. (MIRA & MARQUEZ, 2000)

Aung et al (1997) observaram dois casos de jovens com HPA-PAH, que apresentaram anemia megaloblástica, e sugerem a suplementação oral dessa vitamina, bem como avaliação hematológica.

O objetivo nutricional para pacientes com HPA-PAH é o mesmo da população em geral, ou seja, visa o crescimento normal e a prevenção de deficiências (BARNES; CURRAN, 1996 apud PRZYREMBEL & BREMER, 2000). Contudo, a dieta restrita em Phe mostrou ter efeito positivo para o desenvolvimento mental, mas um efeito negativo no crescimento físico (DOBBELAERE et al., 2003). É especialmente nos primeiros anos de vida que a restrição do crescimento é mais evidente (VERKERK et al., 1994). Giovannini et al. (2007) relataram também a presença de sobrepeso em crianças com HPA-PAH, até mesmo nas que têm sua ingestão dietética monitorada rotineiramente.

O acompanhamento de pacientes baseia-se em uma equipe multidisciplinar composta de médico, nutricionista, psicólogo e assistente social, onde ao nutricionista

cabe realizar as orientações dietéticas, além do acompanhamento e avaliação de um adequado desenvolvimento antropométrico dos pacientes (BRASIL, 2002).

As mulheres com HPA-PAH devem receber aconselhamento genético sobre os efeitos teratogênicos das altas concentrações de Phe no plasma durante a gravidez. Uma dieta rigorosa restrita em Phe deve iniciar alguns meses antes da concepção, a fim de manter concentrações normais de Phe no plasma. Após a concepção, a orientação nutricional e médica é essencial, assegurando, assim, o aporte adequado de energia com a proporção apropriada de proteína, gordura e hidratos de carbono (TREFZ & BLAU, 2003) .

O início do tratamento a partir do segundo ou terceiro trimestre de gestação pode não ter o efeito esperado, a criança pode vir a apresentar baixo peso, microcefalia e o retardo mental costuma ser irreversível (KNERR et al, 2005; WILLIAMS, 2008).

Assim, não devem ser poupados esforços para que mulheres com HPA-PAH sejam diagnosticadas antes da concepção, para que a gravidez seja assistida corretamente (MIRA & MARQUEZ, 2000)

2.3.11 Tratamentos em desenvolvimento

Embora o tratamento dietético restrito em Phe tenha sido bem sucedido, a pobre palatabilidade da mesma resulta em falta de cumprimento da dieta, principalmente por adolescentes e adultos (WATER et al, 2006). Conseqüentemente, algumas terapias estão sendo investigadas e desenvolvidas para melhor atender as necessidades desses pacientes. Essas terapias são: (MATALON, 2006).

➤ Suplementação de *Large Neutral Amino Acids* (LNAA)

A suplementação de LNAA reduz a concentração de Phe no cérebro, mesmo com níveis plasmáticos elevados da mesma, uma vez que Phe, Tyr, triptofano, isoleucina, leucina e valina competem pelo mesmo transportador (*L-tyro aminoacid carrier*) para ultrapassar a barreira sanguínea do cérebro (WATER et al, 2006).

Um transportador de LNAA semelhante também existe no intestino e a suplementação com diferentes formulações de LNAA reduzem a concentração de Phe sanguínea em até 50% em um pequeno grupo de indivíduos com HPA-PAH. Esses suplementos não irão substituir a dieta restrita em Phe, mas podem auxiliar no aumento da tolerância de Phe da dieta em indivíduos tratados (MATALON et al, 2003).

➤ Terapia com Suplementação de BH₄

Estudos relatam que certos pacientes com monoterapia oral com BH₄ (5-20mg/Kg) podem diminuir os níveis de Phe no sangue de certos pacientes (WALTER et al, 2006). Recentemente, estudos clínicos mostram que um subconjunto de crianças com HPA-PAH respondem a terapia de BH₄, dependendo da mutação no gene da PAH (HENNERMANN et al, 2005). *Sapropterin dihidroclorato* (*Kuvan*®) é uma forma sintética oral do BH₄. A fase II e III dos ensaios clínicos mostraram que o *Kuvan*® é uma terapia segura e eficaz em pacientes com HPA-PAH com forma leve e moderada e também para alguns pacientes com a forma mais grave, desde que respondam positivamente a testes de sobrecargas com BH₄ (BURNETT et al, 2007).

➤ Terapia Enzimática

Nem todos os paciente com formas mais graves de HPA-PAH ou até mesmo alguns HPA Não-PKU respondem ao tratamento com BH₄, presumivelmente porque esses indivíduos possuem baixa ou até mesmo ausência da atividade residual da

enzima PAH para estimulação por BH₄. Tais não-respondedores poderiam se beneficiar mais da terapia com a enzima fenilalanina amônia liase (PAL) (WILLIAMS, 2008). Diferentemente da PAH, PAL é uma enzima autocatalítica que não requer um co-fator. Nessa terapia a PAL converte a Phe em quantidades metabolicamente insignificantes de amônia e de ácido trans-cinâmicos, um metabólito inofensivo que posteriormente é convertido em ábenzóico e rapidamente excretado na urina como hipurato (KARAM, 2004). A via oral da PAL é dificultada pela degradação preteolítica, enquanto a PAL injetada é dificultada pelo aumento da imunogenicidade. Estudos têm sido realizados para investigar modificações na enzima PAL que poderam diminuir a imunogenicidade e prolongar sua atividade (GAMEZ et al, 2005; SARKISSIAN et al, 1999).

➤ Terapia Gênica

Nessa forma de tratamento, a tecnologia de transferência do gene poderia ser usada para introduzir um gene normal recombinante no fígado ou em outros tecidos de um indivíduo afetado para suprir a função do gene defeituoso. Essa abordagem requer: a clonagem da PAH que produza a proteína funcional; um vetor que possa eficientemente transferir este clone aos hepatócitos ou a outra célula alvo somática onde a proteína PAH possa funcionar apropriadamente; e um modelo animal, como camundongo, para determinação da eficiência relativa dos diferentes métodos de transferência gênica. Os resultados em animais mostraram-se bons a curto prazo, mas o efeito terapêutico obtido não persiste por longo tempo e uma administração repetida não replica o efeito original, o que sugere que uma resposta imune contra o vetor, no caso adenovírus, possa ter sido a responsável pela falência no tratamento repetido (EISENSMITH & WOO, 1996; KARAM, 2004).

Estudos sobre terapia gênica para PKU prosseguem e trazem expectativas de um tratamento definitivo no futuro (WILLIAMS, 2008).

2.4 TETRAHIDROBIOPTERINA (BH₄)

2.4.1 Definição

O BH₄ é um cofator essencial para vários processos e provavelmente está presente em todas as células e organismos. Ele é requerido para várias reações enzimáticas, bem como para algumas funções celulares (THONY et al, 2000).

A síntese do BH₄ ocorre em três etapas, a partir da guanosina trifosfato (GTP). Na primeira etapa, a enzima GTP ciclohidrolase (GTPCH) cataliza a conversão do nucleotídeo GTP em 7,8-dihidroneopterina trifosfato (NH₂TP). Na segunda etapa, a enzima 6-piruvoil-tetrahidroneopterina (PTPS) cataliza a conversão de NH₂TP em 6-piruvoil-tetrahidropterina (PPH). A última etapa da síntese do BH₄ inclui a enzima sepiapterina redutase (SR), que cataliza a conversão de PPH em 6-piruvoil-tetrahidrobiopterina (BH₄). Apesar da SR ser suficiente para completar a biosíntese do BH₄, outras redutases alternativas podem atuar na redução do PPH a BH₄ (figura 5) (MARTÍNEZ-PARDO & GÁRCIA-MUOZ, 2006).

Como a síntese do cofator não é suficiente para controlar a Phe hepática e a homeostase dos neurotransmissores no cérebro, a regeneração do cofator BH₄ é essencial. Durante a reação de hidroxilação, o BH₄ é convertido a Pterina-4a - carbinolamina que é regenerado através de duas enzimas, a dihidropteridina redutase

(DHPR) e a pterina-4-carbinolamina desidrogenase hidroxilase (PCDH), via quinonoide-dihidrobiopterina (qBH₂) (BLAU et al, 2001).

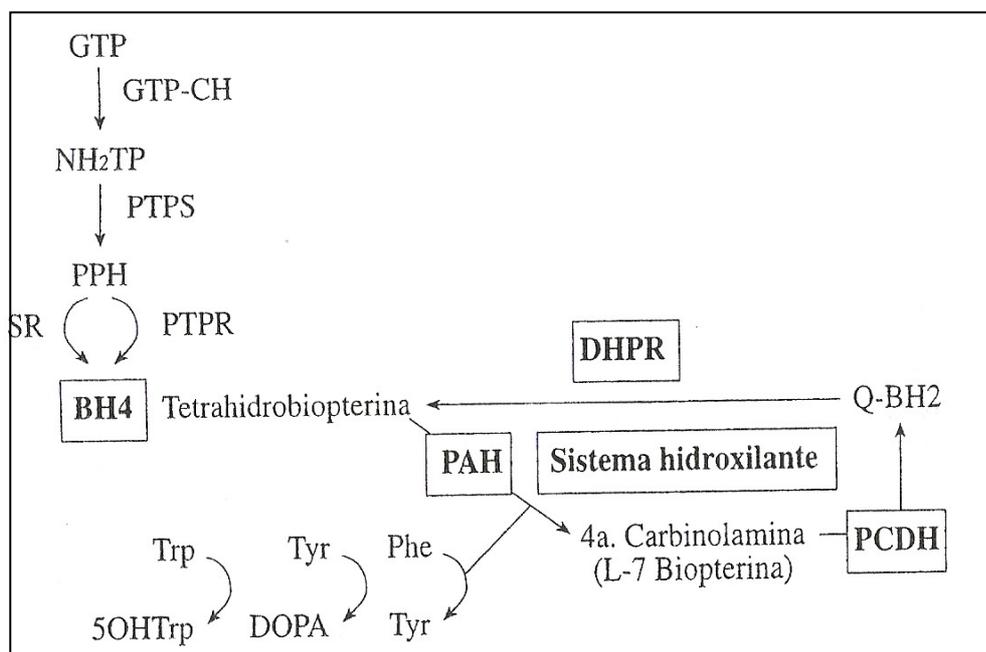


Figura 5. Síntese e regeneração do cofator BH₄. GTP, guanosina trifosfato; GTPCH, guanosina trifosfato ciclohidrolase; NH₂TP, 7,8-dihidroneopterina trifosfato; PTPS, 6-piruvil-tetrahidroneopterina; PPH, 6-piruvil-tetrahidropterina; SR, sepiapterina redutase; BH₄, tetrahidrobiopterina, DHPR, dihidropteridina redutase; PCDH, pterina-4-carbinolamina desidrogenase hidroxilase; qBH₂, quinonoide-dihidrobiopterina; Phe, fenilalanina; Tyr, tirosina.

Fonte: Adaptado de MARTÍNEZ-PARDO & GÁRCIA-MUOZ (2006)

O BH₄ é um cofator natural para as enzimas PAH, tirosina-3-hidroxilase e triptofano-5-hidroxilase. Essas duas últimas enzimas são de extrema importância na biosíntese de neurotransmissores dopamina e serotonina (MARTÍNEZ-PARDO, GÁRCIA-MUOZ, 2006).

A Phe e o BH₄ são os principais reguladores da PAH. Enquanto a Phe é um efetor alostérico positivo (ativador) que converte enzima ativa em enzima cataliticamente competente, o BH₄ é um efetor negativo que concorre com a ativação da Phe para formar o complexo PAH-BH₄. Assim, o BH₄ desempenha importante papel regulador no sistema de hidroxilação da Phe (THONY et al, 2000).

Além da hidroxilação de aminoácidos aromáticos, o BH₄ também age como cofator de sintase do óxido nítrico. Foi demonstrado que o BH₄ estimula todas as isoformas do sintase do óxido nítrico e que a atividade enzimática basal ocorre devido à quantidade residual de BH₄ estreitamente vinculada à proteína. A correlação da quantidade de BH₄ vinculada à atividade da enzima sugere claramente que esse é um cofator essencial de sintase do óxido nítrico. Adicionalmente, o BH₄ também é cofator da gliceril-éter monooxigenase na hidroxilação do carbono alfa da cadeia carbonada lipídica do éter-gliceril para alfa-hidroxiáquil-glicerol. (THONY et al, 2000).

Do ponto de vista celular, o BH₄ possui função na proliferação celular de *Crithidia fasciculata*, células hematopoiéticas e várias linhagens celulares de mamíferos. No sistema nervoso, o BH₄ tem sido sugerido como fator de auto-proteção da toxicidade do óxido nítrico, com geração de superóxido em neurônios produtores de óxido nítrico (KOSHIMURA et al, 1998).

2.4.2 Tetrahidrobiopterina (BH₄) na HPA-PAH

Em 1999, Kure et al descreveram quatro pacientes com HPA-PAH que apresentaram diminuição acentuada da concentração de Phe no sangue mediante a administração do cofator BH₄, abrindo novas possibilidades terapêuticas para os indivíduos afetados. Desde então, numerosos estudos têm confirmado esse achado (PEREZ-DUENAS et al, 2004; MATALON et al, 2005; FIEGE et al, 2005; FIEGE & BLAU, 2007; BERNEGGER & BLAU, 2002; MITCHELL et al, 2005; MATALON et al, 2004; BLAU & ERLANDSEN, 2004; OKANO et al, 2004; MUNTAU et al, 2002;

HENNERMANN et al, 2005; LEVY et al, 2007a; TREFZ et al, 2009). A partir desses estudos, fica evidente que cerca de 20 a 50% dos pacientes com HPA-PAH alcançam redução $\geq 30\%$ dos níveis de Phe no sangue associada ao uso de BH₄. A maioria dos indivíduos responsivos ao BH₄ pertence ao grupo com PKU Atípica (80%) e menos de 10% pertence ao grupo de PKU Clássica (BLAU et al., 2009).

A nova formulação de BH₄ ((6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina dihidroclorido, Sapropterin dihidroclorido, Kuvan[®]) foi aprovada pela FDA e EMEA para tratamento de HPA- PAH nos EUA e Europa, respectivamente. A FDA e o EMEA concederam ao Kuvan[®] o *status* de droga-órfã para o tratamento de PKU. Além disso, a FDA concedeu ao Kuvan[®] a designação de *Fast Track*, que se destina a facilitar o desenvolvimento e acelerar a análise dos novos medicamentos que são destinados ao tratamento de condições graves ou com risco de vida e demonstrar o potencial para resolver necessidades médicas não satisfeitas (BURNETT, 2007).

Ensaio clínico controlados têm avaliado a eficiência e segurança do Sapropterina (forma sintética do BH₄) em pacientes com HPA-PAH (**tabela 4**). Recentemente, um estudo de fase III, *cross-over* e duplo-cego demonstrou que o sapropterina é eficiente para o tratamento de pacientes HPA-PAH responsivos ao mesmo (LEVY et al, 2007b).

Ensaio clínico de fase III, multicêntrico, duplo-cego, placebo-controlado, randomizado, foi realizado em 89 crianças com PKU que tinham restrição dietética de Phe para avaliar a eficácia e segurança do Sapropterina no aumento da tolerância à Phe. O tratamento com o Sapropterina (20mg/kg/dia) foi continuado por mais 10 semanas naqueles pacientes que alcançaram a redução de pelo menos 30% na concentração de Phe no sangue durante a primeira semana de tratamento. Como resultado, o Sapropterina aumentou significativamente a tolerância à Phe e reduziu os níveis sanguíneos de Phe. Após 10 semanas, os pacientes foram capazes de tolerar um

total médio de 43,8 de Phe/kg/dia. O Sapropterina também causou uma redução média de 148,5 μM na concentração de Phe no sangue em comparação com o nível basal (TREFZ et al, 2009).

Estudo com 489 pacientes (média de idade 22 anos; range: 8-49 anos) demonstrou que 8 dias de *sapropterina dihydrochloride* (10mg/Kg/dia) reduziu $\geq 30\%$ a média de Phe no sangue em cerca de um quinto dos pacientes, com uma redução média dos níveis de Phe no sangue de $-392 \pm 185 \mu\text{mol/L}$ (BURTON et al., 2007).

Tabela 4. Resumo dos Ensaio Clínicos com Sapropterina dihydrochloride em pacientes com HPA-PAH

Autor	Delin.	N	Dose BH ₄	Duração	Achados	EA
Levy et al, 2007a	PC, DC, R	89	10mg/kg	6 semanas	A média da concentração de Phe no sangue foi 236 μM menor no grupo tratado com Kuvan, em comparação ao grupo placebo, que demonstrou uma elevação de 3 μM nos níveis de Phe no sangue (os paciente do grupo tratado com Kuvan apresentaram redução superior a 30% nos seus níveis sanguíneos de Phe). Na semana 6, 54% dos pacientes do grupo tratado com Kuvan apresentaram concentrações de Phe no sangue menores de 600 μM , em comparação com 23% do grupo placebo (p=0,004)	Leve a moderados. EA mais frequentes: Dor de cabeça e infecção no trato respiratório. Não houve diferença entre o grupo tratado e o grupo placebo (23% e 20%, respectivamente)
Lee et al, 2008	OL, NC	80	5-20 mg/kg	22 semanas	A dose de Kuvan reduziu a concentração de Phe no sangue em 100, 204 e 263 μM para doses de 5, 10 e 20 mg/kg/dia, respectivamente. Kuvan foi eficiente na redução da concentração de Phe no sangue e foi bem tolerado em doses de 5-20 mg/kg/dia durante 22 semanas em pacientes com PKU.	Leve a moderados
Trefz et al, 2009	PC, DC, R	89	20mg/kg	8 semanas	A média de Phe no sangue reduziu de 317 \pm 173 $\mu\text{mol/L}$ para 108 \pm 70 $\mu\text{mol/L}$. Em 56% dos pacientes, houve uma redução de Phe $\geq 30\%$.	Leve a moderados. Não houve diferença entre o grupo tratado e o grupo placebo (27% e 25%, respectivamente)

Delin.:Delineamento; EA: Efeitos Adversos; OL: open-label; NC:Não-Controlado; PC:Placebo Controlado; DC: Duplo-Cego; R: Randomizado

Fonte: Adaptado de Blau et al (2009)

Embora os estudos sobre o tratamento a longo prazo com Sapropterina em pacientes HPA-PAH ainda sejam escassos, eles indicam que a terapia com

Sapropterina tem um fator positivo, resultando no aumento da tolerância à Phe na dieta (BURLINA & BLAU, 2009; TREFZ & BLAU, 2003; FIEGE et al., 2005).

É importante salientar que o Sapropterina pode ter importantes implicações também para o tratamento do PKU Materna. A suplementação de Sapropterina pode permitir uma dieta mais completa, minimizando o risco de deficiências nutricionais associadas com uma dieta com teor baixo de proteína. Estudos demonstraram que grávidas foram controladas com sucesso com a suplementação de Sapropterina. Porém, mais estudos precisam ser realizados para comprovar, a segurança e eficácia desse tratamento alternativo na gravidez (KOCH et al, 2005).

2.4.2.1 Teste de sobrecarga com BH₄

Habitualmente, a identificação dos pacientes com HPA-PAH sensíveis ao BH₄ realiza-se mediante o teste de sobrecarga com BH₄ (MATALON, 2005). Um protocolo padrão do teste de sobrecarga de BH₄ está sendo discutido atualmente, uma vez que não existe acordo unânime com relação à sua metodologia, nem sobre a interpretação de seus resultados. Uma série de diferentes protocolos vêm sendo seguidos utilizando a administração oral do BH₄ ou sua forma sintética, o Sapropterina. Esses estudos incluem a utilização de uma dieta normal ou de uma dieta restrita em Phe, diferentes doses de BH₄ e/ou Sapropterina, diferentes períodos de tempo para avaliar os efeitos do mesmo na concentração sanguínea de Phe (um teste de 24h e/ou 48h pode detectar responsivos lentos mais eficientemente do que um teste de 8h), tratamento de administração de dose única ou doses múltiplas de BH₄, e mensuração

dos níveis sanguíneos de Phe ou a meia-vida da redução da Phe no sangue (BLAU et al, 2009).

O protocolo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para terapia inicial com Sapropterina em pacientes acima de 4 anos de idade consiste em: A mensuração de Phe no sangue é seguida de uma dose diária inicial de 10mg/Kg/dia de Sapropterina durante uma semana. Após o término dessa semana, a mensuração de Phe no sangue é repetida. Se a redução clinicamente significativa de Phe não é observada, a dose de Sapropterina pode ser aumentada para 20mg/Kg/dia e os níveis sanguíneos de Phe são mensurados 1-2 semanas após esse tratamento que tem um período máximo de 1 mês. Após esse período, se o paciente não obteve redução significativa de Phe, o tratamento é interrompido e o paciente é classificado como não-responsivo. Mas, se o paciente apresentar redução nos níveis de Phe, ele é classificado como responsivo e assim, a dose de Sapropterina é ajustada (alvo:5-20mg/Kg/dia), de acordo com os níveis de Phe no sangue, que devem ser monitorados freqüentemente. A restrição dietética de Phe é mantida ao longo do protocolo. É bom salientar que nesse protocolo não define um ponto específico de corte para a redução clinicamente significativa dos níveis de Phe. Contudo, esse método pode gerar resultados falsos positivos e falsos negativos se os pacientes ajustarem suas dietas durante o protocolo. (BLAU et al, 2009).

Quando comparamos o protocolo aprovado pela FDA com o protocolo aprovado pela EMEA, observamos que a logística é a mesma, entretanto, cabe ressaltar que no protocolo da EMEA existe um ponto de corte para redução dos níveis de Phe, definido com redução $\geq 30\%$ dos níveis de Phe.

Um número de publicações demonstrou que um protocolo de 24h com dose única de 20 mg/Kg de Sapropterina (BLAU, 2008) seguidas por mensuração de níveis

sanguíneos de Phe em pontos de hora (0, 4, 8 e 24h), considerando um ponto de corte de pelo menos 30% na redução do Phe no sangue, é um método viável e eficiente. Utilizando esse teste, a prevalência global de pacientes responsivos ao BH₄ é de 46% (BLAU, 2008). Entretanto, esse protocolo não é coerente com a Informação de Prescrição do Kuvan[®] (sapropterin dihydrochloride) homologada pela FDA.

Recentemente, na Europa, Blau et al (2009) propuseram um protocolo otimizado de 48h, baseada em experiências europeias obtidas nos últimos 8 anos com a fórmula não registrada do BH₄. O protocolo propõe a redução ou até mesmo de interrupção da dieta restrita em Phe, se presença de resposta adequada ao BH₄. O protocolo consiste em: No dia 0 (zero), o paciente realiza a mensuração dos níveis de Phe no sangue em pontos de hora (8, 12 e 24h), para observar a variação diária de Phe. No dia 1, o paciente recebe 20 mg/Kg de Sapropterina seguidas de mensurações dos níveis sanguíneos de Phe nos mesmos pontos de hora, para detectar responsivos iniciais. Se o paciente tiver uma redução nos níveis de Phe no sangue de pelo menos 30% nos pontos de hora (8,16 e 24h), ele é detectado como responsivo e, assim, as doses de Sapropterina são ajustadas (alvo: 5-20mg/Kg/dia) para manter os níveis sanguíneos de Phe, que devem ser monitorados frequentemente. Mas se o paciente não apresentar essa redução de Phe no sangue, no dia 2 é feito um segundo teste. O paciente receberá uma outra dose de 20 mg/Kg de Sapropterina seguidas de mensurações dos níveis sanguíneos de Phe nos mesmos pontos de hora, para detectar responsivos mais lentos. Mas se o paciente novamente não apresentar a redução de Phe no sangue de pelo menos 30%, o tratamento é interrompido e o paciente é classificado como não-responsivo. É bom salientar que a decisão da combinação de Sapropterina com dieta restrita em Phe, ou a introdução da monoterapia com Sapropterina, é

baseada na tolerância individual de Phe e na recomendação terapêutica (níveis alvo) de Phe no sangue dentro dos níveis satisfatórios.

2.4.2.2 Definindo Responsividade ao BH₄

Embora não haja ainda uma definição padrão-ouro e nem recomendações claras sobre como interpretar os dados da responsividade ao BH₄ (BLAU et al., 2009), a maioria dos estudos considera como responsivos aqueles indivíduos que respondem a administração oral de Sapropterina (10-20mg/Kg) com redução $\geq 30\%$ de seus níveis sanguíneos de Phe entre 8h e 24h após a ingestão do medicamento. (BLAU & ERLANDSEN, 2004; BLAU et al., 2009; ZURFLUH et al., 2008). É bom salientar que uma redução de pelo menos 30% nos níveis de Phe no sangue é frequentemente exigida para indicar uma resposta significativa do tratamento; No entanto, é importante notar que a determinação desse limiar é arbitrária e alguns autores consideram que uma redução menor pode ser significativa (BLAU et al, 2009; FIEGE & BLAU, 2007).

2.4.2.3 Genótipo e Responsividade ao BH₄

A genotipagem representa outro meio de identificação de potenciais pacientes sensíveis ao tratamento com BH₄, e uma série de mutações específicas no gene da PAH foram associadas com responsividade ao BH₄. A figura 6 sumariza as mutações detectadas em pacientes HPA-PAH responsivos ao BH₄. Um total de 75 mutações

(BH₄-responsivas e BH₄-não responsivas), foram descritos em 121 pacientes, em sua maioria heterozigotos compostos. A mutação p.R408W foi a mais comum (25 alelos), seguida pela p.Y414C (23 alelos), p.A403V e p.R241C (14 alelos cada), p.A300S e p.E390G (8 alelos cada), IVS12nt+1g>a (7 alelos), p.R413P (6 alelos) e p.I65T, p.R68S e p.R158Q (5 alelos cada). A lista completa de mutações está disponível no BIOPKU *database* (http://www.biopku.org/BH4_Start.asp) (BLAU & ERLANDSEN, 2004).

Algumas mutações associadas à responsividade ao BH₄ foram expressas através de recombinação em sistema de células eucarióticas ou em *Escherichia Coli*, e verificou-se que tinham uma substancial atividade residual. Cerca de 62% de todas as mutações estão localizadas no domínio catalítico da PAH, 21% no domínio regulatório, 5% (4 mutações) estão localizadas no domínio de tetramerização e 19% (9 mutações) são intrônicas. Apenas algumas dessas mutações descritas estão localizadas dentro das duas regiões de ligação do cofator: CBR1 (p.V245A, p.R252W, p.R261X e p.R261Q) e CBR2 (p.P281A, p.P281S e p.P281L) e somente duas delas (p.V245A e p.R261Q) parecem estar associados com a responsividade ao BH₄. (ERLANDSEN, 2003).

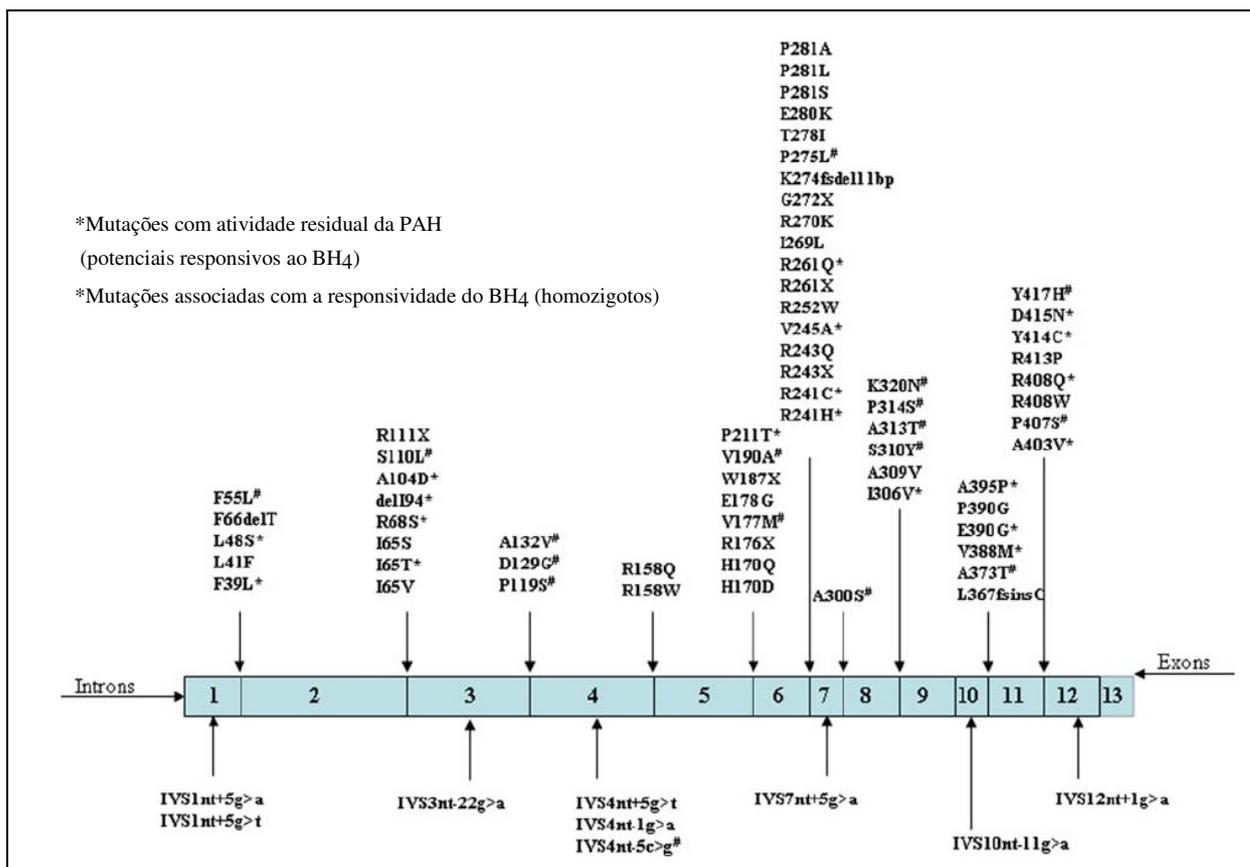


Figura 6. Mutações detectadas em pacientes com HPA-PAH responsivos ao BH₄

Fonte: Blau e Erlandsen (2004)

Através dos genótipos detectados nos pacientes responsivos ao BH₄, sugere-se que a combinação de mutações na PAH é o indicador mais importante na responsividade do BH₄. Duas mutações severas encontradas nos alelos da PAH estão provavelmente associadas com a PKU Clássica e, portanto, por haver pouca ou nenhuma atividade enzimática da PAH, esses pacientes são classificados como não responsivos ao BH₄ (BLAU & ERLANDSEN, 2004). Entretanto, alguns pacientes com PKU Clássica têm sido relatados com responsivos ao BH₄, todos eles com pelo menos um alelo parcialmente ativo (MATALON et al, 2004). Da mesma forma, pacientes com duas mutações leves que têm atividade residual relativamente elevada, provavelmente estão associadas a HPA e PKU atípica e possivelmente são sensíveis ao BH₄. A combinação de uma mutação leve com uma mutação severa é em geral questionável em relação a

responsividade ao BH₄, variando conforme a combinação do tipo de mutação presente no genótipo. Assim, a maioria dos genótipos encontrados atualmente consiste em uma mutação leve e uma mutação severa, ou duas mutações relativamente leves (com atividade enzimática elevada) (BLAU & ERLANDSEN, 2004). É importante salientar que a responsividade ao BH₄ não foi encontrada naqueles pacientes com duas mutações nulas tanto no estado homoalélico como no heteroalélico. Essa observação sugere que ter alguma atividade residual na PAH é um pré-requisito para a responsividade ao BH₄ e que mutações graves que causam importantes distorções na expressão da proteína, podem levar a atividade residual da PAH muito reduzida ou mesmo indetectável, não sendo, estes pacientes suscetíveis de serem estimulados pelo BH₄ (ERLANDSEN, 2006).

Um estudo mostrou que diferentes pacientes HPA-PAH com as mesmas mutações específicas no gene PAH podem diferir em relação à responsividade ao BH₄. No entanto foi relatado posteriormente, que em um dos pacientes foi inicialmente administrada a formulação antiga do BH₄ e que ambos os irmãos passaram a apresentar a mesma resposta ao BH₄. Os autores concluíram que outros fatores (farmacocinética do BH₄), além do genótipo da PAH, podem afetar a responsividade ao BH₄ (LINDNER et al., 2001).

Baseado no conhecimento atual sobre as propriedades regulatórias do cofator BH₄ e do substrato Phe, os mecanismos moleculares responsáveis pela responsividade do BH₄ em pacientes HPA-PAH ainda são pouco conhecidos. Porém, inúmeras possibilidades estão sendo sugeridas, tais como: (1) Km mutante da PAH com afinidade de ligação reduzida para BH₄; (2) Estabilização da PAH pela atividade de chaperona da PAH; (3) Alterações na regulação da biosíntese do BH₄; (4) Indução na expressão da PAH pelo BH₄; e (5) Estabilização do RNAm da PAH (BURNETT,

2007; ERLANDSEN, 2006; ZURFLUH et al, 2008). Acredita-se que os mecanismos responsáveis pela responsividade do BH₄ em pacientes com PKU são multifatoriais e certamente mais estudos devem ser realizados para comprovar esses achados. (BLAU & ERLANDSEN, 2004; THONY et al, 2006; BULINA e BLAU, 2009).

Segundo Blau et al (2009), o uso da genotipagem para prever a responsividade ao BH₄ é complicado pelo fato da maioria dos pacientes serem heterozigotos compostos. Embora a genotipagem possa ser útil de alguma forma em prever uma elevada ou reduzida responsividade ao BH₄, essa abordagem requer mais investigações antes de ser utilizada como teste definitivo. Recentemente, Zurfluh et al (2008) relataram os genótipos de 315 pacientes que responderam ao teste de sobrecarga de BH₄ com redução dos seus níveis sanguíneos de Phe. A análise do DNA desses pacientes identificou 57 mutações no gene da PAH e a prevalência do genótipo-preditor da responsividade ao BH₄ mostrou-se superior ao que se esperava pelo teste de sobrecarga com BH₄. Assim, a responsividade ao BH₄ pode não ser previsível exclusivamente com base nas mutações do gene da PAH, mas potenciais não-responsivos ao BH₄ podem ser identificados.

2.4.2.4 Perfil Farmacológico do BH₄

O *sapropterin dihydrochloride*, princípio ativo dos comprimidos do Kuvan®, é a forma sintética do BH₄. Um comprimido do Kuvan® contém 100 mg de *sapropterin dihydrochloride* (equivalente a 76,8 mg de base de sapropterin). Cada comprimido contém os seguintes ingredientes inativos: ácido ascórbico, crospovidona, fosfato de

cálcio dibásico, D-manitol, riboflavina e fumarato de sódio. A dosagem do Kuvan® é baseada no peso de cada paciente. Essa dosagem é normalmente ajustada de acordo com a tolerância de Phe e com os níveis-alvo recomendados para a Phe sanguínea. As doses do Kuvan® podem variar de 5 a 20 mg/Kg/dia (BLAU et al, 2009; Kuvan® US, Prescribing Information, 2008) .

O Kuvan® pode ser administrado oralmente nas refeições para aumentar a sua absorção, de preferência pela manhã. Ele também pode ser dissolvido em água, suco de laranja ou na fórmula metabólica. Adolescentes e adultos podem receber o comprimido pela via oral, sem dissolvê-lo (BLAU et al, 2009).

Segundo a bula norte-americana do Kuvan®, os efeitos adversos associados ao uso deste medicamento, em ensaios clínicos nos quais os pacientes receberam 10-20 mg/kg/dia de Sapropterina durante 6-10 semanas, foram semelhantes ao do grupo placebo. Esta bula também informa que não existem contra-indicações ao uso do Sapropterina, e que este medicamento deve ser usado com cautela em pacientes com doença hepática, que apresentem alergia a algum dos seus componentes, que façam uso de levodopa ou de medicamentos que afetam o metabolismo do folato ou a vasodilatação mediada por óxido nítrico (situações que não costumam ser encontradas em pacientes com PKU) (Kuvan® US, Prescribing Information, 2008)

Os efeitos colaterais mais comumente relatados com o uso Sapropterina são: dor de cabeça, diarreia, dor abdominal, infecção no trato respiratório, dor de garganta, náuseas e vômitos (BLAU et al, 2009).

Em relação ao uso desse medicamento em populações específicas, o Sapropterina não deve ser tomado durante a amamentação e, deve ser usado em mulheres grávidas somente quando a restrição dietética de Phe não for suficientemente eficaz. Estudos clínicos envolvendo pacientes com PKU com idade acima de 65 anos ainda não foram

realizados. Não se sabe se esses pacientes respondem de maneira diferente do que os pacientes mais jovens. Da mesma forma, a segurança e eficácia do Sapropterina, em pacientes pediátricos menores de 4 anos de idade ainda não foram avaliadas em estudos clínicos. Entretanto, pacientes pediátricos com PKU, com idades de 4 a 16 anos, foram tratados positivamente com o Sapropterina, em estudos clínicos (Kuvan[®] EU, Prescribing Information, 2008)

Na Europa, o Sapropterina é indicado para tratamento de HPA-PAH em pacientes adultos e pediátricos com PKU (> 4 anos de idade). A monitoração freqüente do sangue é recomendada na população pediátrica para garantir um adequado controle nos níveis sanguíneos de Phe (Kuvan[®] EU, Prescribing Information, 2008).

3. JUSTIFICATIVA

HPA-PAH é uma doença relevante para a população, tanto por ser uma das condições incluídas no Programa Nacional de Triagem Neonatal quanto pelo fato das fórmulas metabólicas necessárias para o seu tratamento fazerem parte do Componente de Medicamentos com Dispensação Excepcional do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002). O tratamento dietético constitui-se no padrão-áureo para o tratamento desta doença (SCRIVER & KAUFMAN, 2001), mas apresenta vários inconvenientes, tal como a restrição da ingestão de alimentos como carne, leite e derivados, os quais acabam afetando a adesão do paciente (PLANA et al., 2006; MIRA & MARQUEZ, 2000; MACDONALD et al., 2000). O Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre iniciou suas atividades em 1982 e, desde então, presta assistência médica e nutricional de pacientes com erros inatos do metabolismo, sendo um dos centros de referência para tratamento de HPA-PAH do estado do Rio Grande do Sul.

Inúmeros estudos internacionais têm indicado redução nos níveis séricos de Phe nos pacientes com HPA-PAH após administração do Sapropterina (BLAU et al., 2009). Nenhum estudo sobre esse tema, no entanto, foi até hoje realizado no Brasil. Por isso, acredita-se ser de grande relevância identificar a proporção de pacientes com HPA-PAH sensíveis ao BH₄ em nosso meio.

Assim sendo, a seguinte questão de pesquisa foi formulada: Qual é, em nosso meio, a proporção de indivíduos com HPA-PAH responsivos ao BH₄, e que poderiam, no futuro, ser beneficiados com essa terapia. A hipótese inicial é que haveria uma redução nos níveis de Phe dos pacientes com HPA-PAH após a administração do BH₄.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar, por meio do teste de sobrecarga com BH₄, os pacientes com deficiência primária da fenilalanina hidroxilase acompanhados no ambulatório de tratamento de distúrbios metabólicos do Serviço de Genética Médica do HCPA que são responsivos à administração de dose única de BH₄ por via oral.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Associar a resposta bioquímica à administração de BH₄ com o tipo de hiperfenilalaninemia por deficiência primária da fenilalanina hidroxilase apresentada pelo paciente.
2. Associar a resposta bioquímica à administração de BH₄ com as mutações presentes no gene fenilalanina hidroxilase.

5. MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

O estudo foi intervencional, transversal, envolvendo uma série de casos.

5.2 POPULAÇÃO EM ESTUDO

A população constituiu nos pacientes com HPA-PAH recrutados do Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ATDM-SGM/HCPA). Dos 70 pacientes que freqüentam esse ambulatório, 38 (54,3%) possuem PKU Clássica, 15 (21,4%) possuem PKU Atípica, 3 (4,3%) possuem HPA Não-PKU e 14 (20%) não tinham seu diagnóstico definido (PKU Indefinido).

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico bioquímico de HPA-PAH, de ambos os sexos, com idade ≥ 7 anos, que possuíam níveis séricos de Phe ≥ 6 mg/dL nos últimos doze meses de vida (em todas as medidas realizadas nos últimos doze meses), que concordaram em participar do estudo mediante assinatura de termo de consentimento e que não se enquadraram nos critérios de exclusão.

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão encontram-se abaixo relacionados:

- a) paciente gestante;
- b) paciente com comprometimento clinicamente significativo da função hepática;
- c) paciente com alergia a algum dos componentes do BH₄;
- d) paciente em uso de levodopa ou de medicamentos que afetam o metabolismo do folato ou a vasodilatação mediada por óxido nítrico;
- e) paciente com nível de Phe < 6 mg/dL em pelo menos uma das análises realizadas nos 12 meses anteriores à sua data de inclusão no estudo.
- f) Acompanhamento irregular nos 12 meses anteriores à sua data de inclusão no estudo.

5.5 TAMANHO AMOSTRAL

A HPA-PAH é uma doença rara, sendo que a amostragem foi por conveniência. Não foi, portanto, calculado tamanho amostral.

5.5.1 Seleção Amostral

A amostra foi selecionada a partir do algoritmo que consta na figura 7.

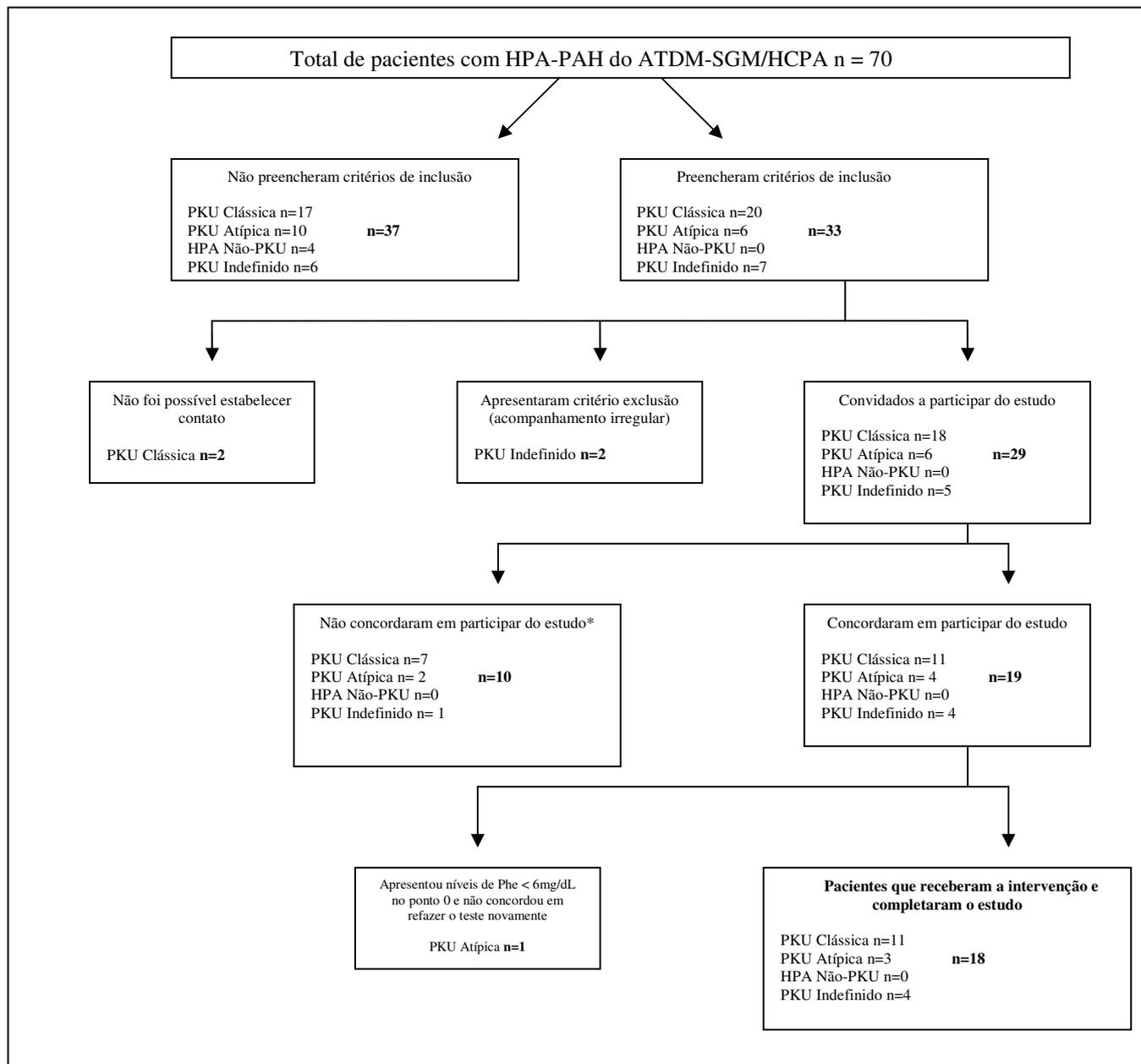


Figura 7. Passos utilizados para a seleção da amostra

* Os pacientes e/ou seus responsáveis não concordaram em participar do estudo alegando não ter disponibilidade de tempo (ausência no trabalho/escola) e/ou falta de interesse na pesquisa.

5.6 VARIÁVEIS

5.6.1 Sócio-demográficas

Dados sobre a caracterização da amostra, tais como data de nascimento, idade, sexo, procedência e consangüinidade foram obtidos por meio da revisão dos prontuários e registrados em formulário específico (APÊNDICE B).

5.6.2 Classificação do tipo de HPA-PAH

A classificação do tipo de HPA-PAH dos pacientes baseou-se no valor da Phe plasmática ao diagnóstico (sem tratamento) (PKU Clássica: Phe > 20 mg/dL ao diagnóstico; PKU Atípica: Phe entre 6 – 20 mg/dL ao diagnóstico; HPA Não-PKU: Phe entre 2 – 6 mg/dL ao diagnóstico) e na presença ou não de algum valor de Phe >20mg/dL pelo um mês após prescrição de dieta restrita em Phe (presença: PKU Clássica, ausência: PKU Atípica). Para ser diagnosticado como PKU Clássica, os pacientes deveriam ter Phe ao diagnóstico > 20 mg/dL e pelo menos algum valor de Phe > 20mg/dL após prescrição do tratamento; Os demais casos, assim como aquele para ser diagnosticado como PKU atípica, os pacientes deveriam ter Phe ao diagnóstico < 20mg/dL e nenhum valor de Phe > 20 mg/dL após prescrição do tratamento. Aqueles com dados não-conhecidos, foram considerados "PKU tipo não-definido". Estes critérios foram utilizados porque a média de idade ao diagnóstico dos pacientes do ATDM-SGM/HCPA é alta (20,5 meses), o que poderia elevar os níveis de Phe ao diagnóstico, sendo um viés de confusão para a classificação do tipo de PKU.

Além disso, como existiam vários problemas em relação à adesão ao tratamento (inclusive falhas no fornecimento da fórmula metabólica aos pacientes, o que é uma função governamental), os níveis de Phe durante o tratamento poderiam ser indicativos do tipo de PKU do paciente (NALIN,2008).

5.6.3 Níveis de Phe

Foram analisados os níveis de Phe nos últimos 12 meses a partir de dados colhidos no prontuário de cada paciente. Esses dados foram registrados em formulário específico (APÊNDICE B). Os pacientes que apresentaram alguma dosagem de Phe abaixo de 6mg/dL nos últimos 12 meses de vida foram automaticamente excluídos do estudo.

O desfecho primário a ser avaliado foi a redução dos níveis de Phe nos pontos **1** (4 horas), **2** (8 horas) e **3** (24 horas) em relação ao ponto basal (ponto **0**). Esta resposta foi correlacionada com as outras dosagens de fenilalanina realizadas no dia anterior ao da sobrecarga de BH₄ em pontos de hora 8/12/16h ou 9/13/17h (ponto 0, ponto 1 e ponto 2, respectivamente), o tipo de HPA-PAH do paciente e com o seu genótipo.

5.6.4 Teste de sobrecarga com BH₄

O teste de sobrecarga (TS) com BH₄ foi realizado no SGM/HCPA entre os meses de Agosto a Setembro de 2009, após a obtenção do consentimento livre e esclarecido pelos pacientes e/ou seus responsáveis.

Os pacientes foram instruídos a permanecerem dois dias no SGM/HCPA fazendo avaliações. Aqueles pacientes que residiam em Porto Alegre foram recebidos no SGM/HCPA para a realização das devidas avaliações, retornando para as suas casas ao final do dia. Já aqueles pacientes que residiam fora de Porto Alegre ficaram hospedados conforme explicado a seguir: (a) pacientes até 18 anos de idade inclusive ficaram na Casa de Apoio do HCPA, com seus devidos acompanhantes. (b) pacientes acima de 18 anos ficaram hospedados no *Hotel Arvoredo* (Rua Cel Fernando Machado, 347. Centro. Porto Alegre), com os seus acompanhantes, sendo os custos cobertos por este projeto.

No primeiro dia de permanência no SGM/HCPA (dia anterior ao TS com BH₄), os pacientes foram submetidos a três coletas de sangue em papel filtro ao longo do dia, nos pontos de hora: 8/12/16h ou 9/13/17h (ponto 0/ ponto 1/ ponto 2, respectivamente) (conforme hora de chegada do paciente no SGM/HCPA). Essas coletas tinham como finalidade mensurar a fenilalanina, sem o uso do BH₄, para observar a variação diária da fenilalanina dos pacientes.

No segundo dia de permanência no SGM/HCPA, foi então aplicado um protocolo modificado do teste de BH₄ (BLAU, 2008), com a administração oral de uma única dose de 20 mg/Kg de BH₄ (sapropterina dihidrocloride, KUVAN®) (Laboratório Merck Serono). Ou seja, no início desse dia o paciente foi submetido a uma coleta de sangue em papel filtro para dosagem de Phe (ponto 0 ou basal). Logo após essa coleta, o paciente ingeriu uma única dose de 20mg/Kg de Sapropterina por via oral. Novas coletas de sangue em papel filtro foram realizadas 4 horas (ponto 1), 8 horas (ponto 2) e 24 horas (ponto3) após a ingestão do medicamento, para dosagem dos níveis de Phe.

Caso algum dos pacientes não apresentasse níveis de Phe > 6 mg/dL no ponto 0 do dia da sobrecarga com BH₄, os mesmos foram instruídos a repetirem este protocolo em momento posterior.

O Sapropterina foi dissolvido em um copo de 120 ml de suco de laranja antes de ser administrado pelos pacientes.

Os pacientes foram instruídos a permanecerem em jejum por pelo menos uma hora antes de todas as coletas de sangue, com o intuito de minimizar possíveis vieses. Além disso, os mesmos também foram instruídos a continuarem com a mesma prescrição dietética de Phe em que estavam antes do início do estudo (ou seja, sua dieta usual).

Todas as coletas de sangue em papel filtro foram realizadas pelo mesmo profissional, previamente treinado e qualificado. Os níveis de Phe no plasma foram determinados através da espectrometria de massa *in tandem* (MS/MS) no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do SGM/HCPA. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas, considerando-se a média das duas dosagens como resultado final.

Todos os custos envolvidos na pesquisa (coletas, transporte, acomodação e alimentação), para o sujeito e um acompanhante, foram cobertos pelo projeto de pesquisa.

A logística do presente estudo está resumida na figura 8.

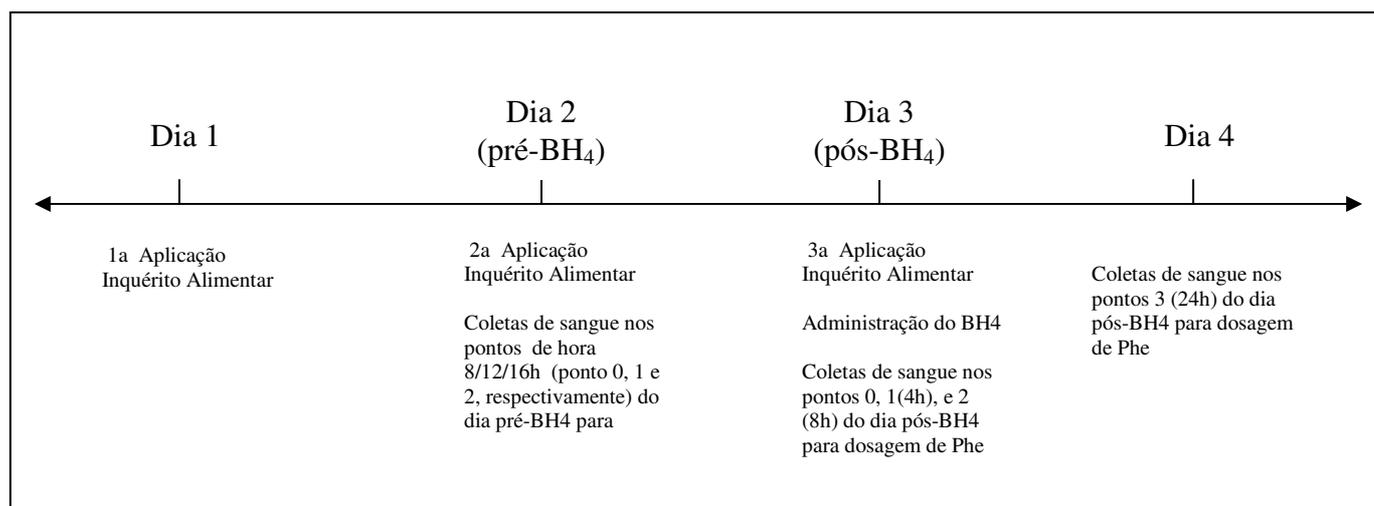


Figura 8. Logística do estudo.

5.6.5 Responsividade ao BH₄

Foram utilizados 2 critérios diferentes para definir a responsividade ao BH₄, conforme descrito abaixo:

a) Critério 1: responsividade ao BH₄ definida através do critério adaptado de Blau et al. (2009), por meio da redução $\geq 30\%$ após 8h da administração do medicamento.

b) Critério 2: responsividade ao BH₄ definida através do protocolo adaptado de Blau (2008) com redução $\geq 30\%$ após 24h da administração do medicamento.

5.6.6 Consumo de Phe

Foi verificado por meio de inquérito alimentar de 3 dias (APÊNDICE C), aplicado ao paciente ou aos seus acompanhantes. Esse inquérito alimentar foi realizado do dia anterior a vinda dos pacientes ao SGM/HCPA até o dia da sobrecarga com o

BH₄ inclusive. A quantidade de Phe prescrita foi verificada no prontuário do paciente e registrada em formulário específico (APÊNDICE B).

O consumo de Phe foi obtido através do cálculo do inquérito alimentar de cada dia utilizando o programa de apoio a nutrição *DietWin* versão Profissional – 2008.

É importante ressaltar que todos os pacientes foram instruídos a continuar a mesma prescrição dietética de Phe em que estavam antes do início do estudo. Os almoços e jantares dos pacientes foram realizados no Refeitório de Acompanhantes do Serviço de Nutrição do HCPA, mediante prescrição nutricional previamente definida em relação a quantidade adequada de Phe que cada paciente deveria ingerir.

5.6.7 Genótipo

A análise das mutações do gene *PAH*, nos pacientes incluídos no estudo, está sendo realizada em projeto paralelo, realizado dentro do SGM/HCPA.

Inicialmente eram pesquisadas mutações mais comuns na nossa região (IVS2+5G>C, p.I65T, p.R261X, p.R261Q, p.R408W e IVS12+1G>A) por PCR em tempo real (Silva et al, 2003). Se os 2 alelos não eram identificados, a amostra era então encaminhada para seqüenciamento da região codificante do gene *PAH*.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações foram digitadas em planilha eletrônica utilizando o programa *Microsoft® Excel*. A análise estatística foi realizada através do Programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 14.0 (SPSS® Inc, Chicago, IL). A análise

descritiva foi realizada com o fornecimento das frequências absolutas e relativas. As variáveis contínuas foram apresentadas como médias \pm desvio padrão e mediana com intervalo interquartil. O teste ANOVA para medidas repetidas foi utilizado para comparar os níveis de Phe ao longo do tempo, assim como para comparar o consumo de Phe ao longo dos três dias de inquérito alimentar. O teste t de Student para amostra pareadas foi utilizado para comparar Phe pré e pós BH₄, em cada ponto de hora. O nível de significância utilizado foi de 5%.

5.8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA sob o número 07-553.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) foi aplicado aos pacientes do ATDM-SGM/HCPA que preencheram os critérios de inclusão e que não apresentaram critérios de exclusão.

6. REFERÊNCIAS

1. Abadie V, Berthelot J, Feillet F, Maurin N, Mercier A, de Baulny HO, et al. Neonatal screening and long-term follow-up of phenylketonuria: the French database. *Early Hum Dev.* 2001 Dec;65(2):149-58.
2. Aung TT, Klieber A, McGinn J, McGinn T. Vitamin B12 deficiency in an adult phenylketonuric patient. *J Inher Metab Dis.* 1997 Aug;20(4):603-4.
3. Bernegger C, Blau N. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002. *Mol Genet Metab.* 2002 Dec;77(4):304-13.
4. Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, MacDonald A, et al. Optimizing the use of sapropterin (BH₄) in the management of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2009 Apr;96(4):158-63.
5. Blau N, Belanger-Quintana A, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, Macdonald A, et al. Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries. *Mol Genet Metab.* 2009 Sep 13.
6. Blau N, Blaskovics M. Hyperphenylalaninemia. In: Blau N, Duran M, Blaskovics M, editors. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases.* London: Chapman & Hall, 1996. p. 65-78.
7. Blau N, Bonafé L, Blaskovics M. Hyperphenylalaninemia. In: Blau N, Duran M, Blaskovics M, Gibson M, editors. *Physician's Guide to the Diagnosis of Metabolic Diseases.* 2nd ed. London: Springer; 2003. p. 89-106.
8. Blau N, Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2004 Jun;82(2):101-11.
9. Blau N, Thöny B, Cotton R, Hyland K. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1725-30
10. Blau N. Defining tetrahydrobiopterin (BH₄)-responsiveness in PKU. *J Inher Metab Dis.* 2008 Feb;31(1):2-3.
11. BRASIL. Lei Federal 8069 de 13 de julho de 1990. Acesso em: Março de 2009a
12. BRASIL. Saúde Bmd. Portaria GM/MS nº 822/GM de 06 de julho de 2001. Acesso em: Março de 2009b

13. Burlina A, Blau N. Effect of BH(4) supplementation on phenylalanine tolerance. *J Inher Metab Dis*. 2009 Feb;32(1):40-5.
14. Burnett JR. Sapropterin dihydrochloride (Kuvan/phenoptin), an orally active synthetic form of BH4 for the treatment of phenylketonuria. *IDrugs*. 2007 Nov;10(11):805-13.
15. Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, et al. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study. *J Inher Metab Dis*. 2007 Oct;30(5):700-7
16. Carvalho T. Programa Nacional de Triagem Neonatal – Resultados obtidos e a experiência dos programas consolidados. *Revista Médica de Minas Gerais*. 2003;S2:109-10.
17. Oliveira A, dos Santos AM, Martins AM, D'Almeida V. Screening for inborn errors of metabolism among newborns with metabolic disturbance and/or neurological manifestations without determined cause. *Sao Paulo Med J*. 2001 Sep 6;119(5):160-4.
18. Clark BJ. After a positive Guthrie--what next? Dietary management for the child with phenylketonuria. *Eur J Clin Nutr*. 1992 Jun;46 Suppl 1:S33-9.
19. Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr*. 1997 Aug;156(8):650-4.
20. Carvalho TM, dos Santos HP, dos Santos IC, Vargas PR, Pedrosa J. Newborn screening: a national public health programme in Brazil. *J Inher Metab Dis*. 2007 Aug;30(4):615.
21. Dianzani I, Giannattasio S, de Sanctis L, Alliaudi C, Lattanzio P, Vici CD, et al. Characterization of phenylketonuria alleles in the Italian population. *Eur J Hum Genet*. 1995;3(5):294-302.
22. DiLella AG, Marvit J, Brayton K, Woo SL. An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature*. 1987 May 28-Jun 3;327(6120):333-6.
23. Dobbelaere D, Michaud L, Debrabander A, Vanderbecken S, Gottrand F, Turck D, et al. Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria. *J Inher Metab Dis*. 2003;26(1):1-11.
24. Donlon J, Levy H, Scriver C. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill; 2004.
25. Eisensmith RC, Okano Y, Dasovich M, Wang T, Guttler F, Lou H, et al. Multiple origins for phenylketonuria in Europe. *Am J Hum Genet*. 1992 Dec;51(6):1355-65.

26. Eisensmith RC, Woo SL. Gene therapy for phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 1996 Jul;155 Suppl 1:S16-9.
27. Elsas L, Acosta P. Suporte nutricional nas doenças metabólicas hereditárias. In: Shils Mea, editor. *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.* 9th ed. São Paulo 2003. p. 1069-127.
28. Erlandsen H, Patch MG, Gamez A, Straub M, Stevens RC. Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. *Pediatrics.* 2003 Dec;112(6 Pt 2):1557-65.
29. Erlandsen H, Pey AL, Gamez A, Perez B, Desviat LR, Aguado C, et al. Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 30;101(48):16903-8.
30. Erlandsen H, Stevens RC. A structural hypothesis for BH4 responsiveness in patients with mild forms of hyperphenylalaninaemia and phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis.* 2001 Apr;24(2):213-30.
31. Erlandsen H. Molecular mechanism of tetrahydrobiopterin-responsiveness. In: Blau N, editor. *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin.* 1st ed. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft; 2006. p. 376-400.
32. Fiege B, Blau N. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria. *J Pediatr.* 2007 Jun;150(6):627-30.
33. Fiege B, Bonafe L, Ballhausen D, Baumgartner M, Thony B, Meili D, et al. Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study. *Mol Genet Metab.* 2005 Dec;86 Suppl 1:S91-5.
34. Food and Drug Administration (FDA). Medical Review (Sapropterin:6R-tetrahydrobiopterina). Disponível em www.fda.gov/cder/foi/nda.pdf (acesso em 30 de Março de de 2009).
35. Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J Biol Chem.* 1998 Jul 3;273(27):16962-7.
36. Gamez A, Perez B, Ugarte M, Desviat LR. Expression analysis of phenylketonuria mutations. Effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J Biol Chem.* 2000 Sep 22;275(38):29737-42.
37. Gamez A, Sarkissian CN, Wang L, Kim W, Straub M, Patch MG, et al. Development of pegylated forms of recombinant *Rhodospiridium toruloides* phenylalanine ammonia-lyase for the treatment of classical phenylketonuria. *Mol Ther.* 2005 Jun;11(6):986-9.

38. Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Fiori L, Riva E. Phenylketonuria: dietary and therapeutic challenges. *J Inher Metab Dis*. 2007 Apr;30(2):145-52.
39. Gizewska M, Cabalska B, Cyrytowski L, Nowacki P, Zekanowski C, Walczak M, et al. Different presentations of late-detected phenylketonuria in two brothers with the same R408W/R111X genotype in the PAH gene. *J Intellect Disabil Res*. 2003 Feb;47(Pt 2):146-52.
40. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L, et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet*. 1998 Jul;63(1):71-9.
41. Güttler F, Gulberg P. Genotype/phenotype correlations in phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Blau N, Hoffmann G, Leonard J, Clarck J, editors. *Physician's Guide to the Treatment and Follow-up of Metabolic Diseases*. New York 2006. p. 25-34.
42. Hanley WB, Feigenbaum AS, Clarke JT, Schoonheydt WE, Austin VJ. Vitamin B12 deficiency in adolescents and young adults with phenylketonuria. *Eur J Pediatr*. 1996 Jul;155 Suppl 1:S145-7.
43. Hennermann JB, Buhner C, Blau N, Vetter B, Monch E. Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2005 Dec;86 Suppl 1:S86-90.
44. Hillman L, Schlotzhauer C, Lee D, Grasela J, Witter S, Allen S, et al. Decreased bone mineralization in children with phenylketonuria under treatment. *Eur J Pediatr*. 1996 Jul;155 Suppl 1:S148-52.
45. Hoffee P. Distúrbios hereditários monogênicos. *Genética Médica Molecular*. 1st ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara; 1998. p. 230-1.
46. Hufton SE, Jennings IG, Cotton RG. Structure/function analysis of the domains required for the multimerisation of phenylalanine hydroxylase. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Feb 17;1382(2):295-304.
47. Impacto social del tratamiento integral de la Fenilcetonuria en Cuba [database on the Internet] [cited 11 Março de 2009]. Available from: <http://www.monografias.com/trabajos25/fenilcetonuria/fenilcetonuria.shtml>.
48. Jardim LB, Palma-Dias R, Silva LC, Ashton-Prolla P, Giugliani R. Maternal hyperphenylalaninaemia as a cause of microcephaly and mental retardation. *Acta Paediatr*. 1996 Aug;85(8):943-6.
49. Jennings IG, Cotton RG, Kobe B. Structural interpretation of mutations in phenylalanine hydroxylase protein aids in identifying genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Eur J Hum Genet*. 2000 Sep;8(9):683-96.

50. John SW, Scriver CR, Laframboise R, Rozen R. In vitro and in vivo correlations for I65T and M1V mutations at the phenylalanine hydroxylase locus. *Hum Mutat.* 1992;1(2):147-53.
51. Karam S, Schwartz I, Giugliani R. Erros Inatos do Metabolismo: Introdução e Aspectos Clínicos. In: Carakushansky G, editor. *Doenças Genéticas em Pediatria*. Rio de Janeiro 2001. p. 153-8.
52. Karam SdM. Avaliação epidemiológica da triagem neonatal para fenilcetonúria no Rio Grande do Sul – 1986-2003 : um estudo de coorte. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
53. Kaufman S. A model of human phenylalanine metabolism in normal subjects and in phenylketonuric patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):3160-4.
54. Knerr I, Zschocke J, Schellmoser S, Topf HG, Weigel C, Dotsch J, et al. An exceptional Albanian family with seven children presenting with dysmorphic features and mental retardation: maternal phenylketonuria. *BMC Pediatr.* 2005;5(1):5.
55. Koch R, Moseley K, Guttler F. Tetrahydrobiopterin and maternal PKU. *Mol Genet Metab.* 2005 Dec;86 Suppl 1:S139-41.
56. Koshimura K, Murakami Y, Tanaka J, Kato Y. Self-protection of PC12 cells by 6R-tetrahydrobiopterin from nitric oxide toxicity. *J Neurosci Res.* 1998 Dec 1;54(5):664-72.
57. Kuvan® US Prescribing Information. Disponível em www.kuvan.com (acesso em 30 de Março de 2009)
58. Kuvan® EU Prescribing Information. Disponível em www.ema.europa.eu (acesso em 30 de março de 2009)
59. Lee P, Treacy E, Combres E, Wasserstein M, Waber L, Wolff J et al. Safety and efficacy of 22 weeks of treatment with sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria. *Am J Med Genet Part A.* 2008; 146A:2851–2859.
60. Lehninger A. *Principles of Biochemistry*. 4^o ed. New York 2004.
61. Levy H, Burton B, Cederbaum S, Scriver C. Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH(4)) in phenylketonuria and its use in treatment. *Mol Genet Metab.* 2007 Dec;92(4):287-91. (a)
62. Levy HL, Milanowski A, Chakrapani A, Cleary M, Lee P, Trefz FK, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet.* 2007 Aug 11;370(9586):504-10. (b)

63. Lindner M, Haas D, Mayatepek E, Zschocke J, Burgard P. Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria differs between patients with the same genotype. *Mol Genet Metab*. 2001 May;73(1):104-6.
64. Lindner M. Treatment of phenylketonuria variants: European recommendations. In: Blau N, editor. *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*. 1st ed. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft; 2006. p. 180-7.
65. Lombeck I, Jochum F, Terwolbeck K. Selenium status in infants and children with phenylketonuria and in maternal phenylketonuria. *Eur J Pediatr*. 1996 Jul;155 Suppl 1:S140-4.
66. Lyon G, Kolodny E, Pastores G. *Neurology of Hereditary Metabolic*. 3^o ed 2006. Marsden D, Levy H. Classification of PKU. In: Blau N, editor. *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*. 1st ed. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft; 2006. p. 92-103.
67. Martínez-Pardo M, Garcia-Muñoz M. Hiperfenilalaninemia por déficit de cofator BH4. In: Sanjurjo P, Baldellou A, editors. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias*. 2th ed. Madrid: Ergon; 2006. p. 319-27.
68. Martins A, Frangipani B, Micheletti C, Oliveira R. *Protocolo Brasileiro de Dietas: erros inatos do metabolismo*. 1^o ed. São Paulo 2006.
69. Marsden D, Levy H. Classification of PKU. In: Blau N, editor. *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*. 1st ed. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft; 2006. p. 92-103.
70. Marzzoco A, Torres B. *Bioquímica Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990.
71. Matalon R, Koch R, Michals-Matalon K, Moseley K, Surendran S, Tying S, et al. Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med*. 2004 Jan-Feb;6(1):27-32.
72. Matalon R, Matalon M. Treatment of phenylketonuria variants: US recommendations. In: Blau N, editor. *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*. 1st ed. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft; 2006. p. 201-19.
73. Matalon R, Michals-Matalon K, Koch R, Grady J, Tying S, Stevens RC. Response of patients with phenylketonuria in the US to tetrahydrobiopterin. *Mol Genet Metab*. 2005 Dec;86 Suppl 1:S17-21.
74. Matalon R, Surendran S, Matalon KM, Tying S, Quast M, Jinga W, et al. Future role of large neutral amino acids in transport of phenylalanine into the brain. *Pediatrics*. 2003 Dec;112(6 Pt 2):1570-4.
75. Mira N, Marquez U. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Revista de Saúde Pública*. 2000:86-96.

76. Mitchell JJ, Wilcken B, Alexander I, Ellaway C, O'Grady H, Wiley V, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria: the New South Wales experience. *Mol Genet Metab.* 2005 Dec;86 Suppl 1:S81-5.
77. Mitchell J, Scriver C. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency [database on the Internet 2007] [cited 29 de Março de 2009]. Available from: <http://www.geneclinics.org/servlet/access?db=geneclinics&>.
78. Muntau AC, Roschinger W, Habich M, Demmelair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, et al. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med.* 2002 Dec 26;347(26):2122-32.
79. Nalin T. Avaliação do estado nutricional de pacientes com fenilcetonúria por deficiência de fenilalanina hidroxilase do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio grande do Sul; 2008.
80. Nowacki P, Byck S, Prevost L, Scriver CR. The PAH mutation analysis consortium database: update 1996. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jan 1;25(1):139-42.
81. Nyhan W, Ozand P. Phenylketonuria. *Atlas of Metabolic Diseases.* London: Chapman & Hall Medical; 1998. p. 109-16.
82. Okano Y, Hase Y, Kawajiri M, Nishi Y, Inui K, Sakai N, et al. In vivo studies of phenylalanine hydroxylase by phenylalanine breath test: diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Pediatr Res.* 2004 Nov;56(5):714-9.
83. Okano Y, Takatori K, Kudo S, Sakaguchi T, Asada M, Kajiwara M, et al. Effects of tetrahydrobiopterin and phenylalanine on in vivo human phenylalanine hydroxylase by phenylalanine breath test. *Mol Genet Metab.* 2007 Dec;92(4):308-14.
84. Perez-Duenas B, Vilaseca MA, Mas A, Lambruschini N, Artuch R, Gomez L, et al. Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2004 Dec;37(12):1083-90.
85. Plana J, Ferri N, Buscá, MAV, Pérez-Dueñas B, Rich E, López L. Hiperfenilalaninemia. In: Sanjurjo P, Baldellon A, editors. *Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias.* 2nd ed. Madrid 2006. p. 305-20.
86. Ponzzone A, Spada M, Roasio L, Porta F, Mussa A, Ferraris S. Impact of neonatal protein metabolism and nutrition on screening for phenylketonuria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 May;46(5):561-9.
87. Przyrembel H, Bremer HJ. Nutrition, physical growth, and bone density in treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr.* 2000 Oct;159 Suppl 2:S129-35.

88. 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 Apr;35(4):301-4.
89. Sanseverino M. Avaliação de um protocolo para o diagnóstico de erros inatos do metabolismo em crianças agudamente enfermas. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); 1993.
90. Silva LC, Carvalho TS, da Silva FB, Morari L, Fachel AA, Pires R, et al. Molecular characterization of phenylketonuria in South Brazil. *Mol Genet Metab.* 2003 May;79(1):17-24.
91. Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, Peevers R, Su H, Heft R, et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):2339-44.
92. Secretaria da saúde do Rio Grande do Sul. Saúde BMD. Manual de normas técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal. Acesso em: Março de 2009.
93. Schmidt B. Fenilcetonúria: aspectos clínicos e terapêuticos: *Pediatria al dia*; 1987.
94. Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
95. Scriver C, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia hydroxylase deficiency. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 1667-724.
96. Scriver C. The Hyperphenylalaninemias. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, editors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995. p. 1015-79.
97. Scriver CC. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, by Robert Guthrie and Ada Susi, *Pediatrics*, 1963;32:318-343. *Pediatrics.* 1998 Jul;102(1 Pt 2):236-7.
98. Scriver CR. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat.* 2007 Sep;28(9):831-45.
99. Smith I, Lee P. The Hyperphenylalaninaemias. In: Fernandes J, Saudubray M, Van Den Bergue G, editors. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment.* 3th ed. Germany: Springer; 2000. p. 171-84.
100. Soliz A, Chandler BD, Vasconcelos E. The Enigmatic Baby: A Practical Approach to the Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism. *International Pediatrics.* 2007;22(4):192-6.

101. Souza C, Schwartz I, Giugliani, R. Triagem neonatal de distúrbios metabólicos. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*. 2002;129-37.
102. Thony B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*. 2000 Apr 1;347 Pt 1:1-16.
103. Trefz FK, Blau N. Potential role of tetrahydrobiopterin in the treatment of maternal phenylketonuria. *Pediatrics*. 2003 Dec;112(6 Pt 2):1566-9.
104. Trefz FK, Burton BK, Longo N, Casanova MM, Gruskin DJ, Dorenbaum A, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Pediatr*. 2009 May;154(5):700-7.
105. Vaccaro T. Identificação de mutações frequentes no gene da fenilalanina hidroxilase por PCR em tempo real. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
106. Vargas P. Controle e Avaliação pelo SUS – APAC's e medicamentos excepcionais. *Revista Médica Minas Gerais*. 2003:123-4.
107. Vaz-Osório R. Programa Nacional de Diagnóstico Precoce (20 anos de rastreio neonatal). *Arquivos de Medicina*. 1999;13(3):193-68.
108. Verkerk PH, van Spronsen FJ, van Houten M, Smit GP, Sengers RC. Predictors of mean phenylalanine levels during the first five years of life in patients with phenylketonuria who were treated early. Dutch National PKU Steering Committee. *Acta Paediatr Suppl*. 1994 Dec;407:70-2.
109. Walter J, Lee P, Burgard P. The Hyperphenylalaninemias. In: Fernandes J, Saudubray M, Van Den Bergue G, Walter J, editors. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment*. 4th ed. Germany: Springer; 2006. p. 221-32.
110. Whitehead H, Holmes J, Roberts R, al-Mandhari NA, Greer A, Thom R, et al. Maternal phenylketonuria 1987 to 1993, pregnancy outcome and early infant development: the Northern Ireland experience. *Br J Obstet Gynaecol*. 1996 Oct;103(10):1041-4.
111. Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev*. 2008 Feb;29(1):31-41
112. Zschocke J, Hoffmann G. *Vademecum Metabolicum Manual de Pediatria Metabólica*. 4th ed. Porto Alegre: Segmento Farma; 2007.
113. Zschocke J, Mallory JP, Eiken HG, Nevin NC. Phenylketonuria and the peoples of Northern Ireland. *Hum Genet*. 1997 Aug;100(2):189-94.

114. Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat.* 2003 Apr;21(4):345-56.
115. Zurfluh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat.* 2008 Jan;29(1):167-75.

7. ARTIGO EM INGLÊS

Artigo enviado para publicação no periódico *Molecular Genetics and Metabolism*.

Tetrahydrobiopterin responsiveness in Brazilian patients with phenylalanine hydroxylase deficiency

Luciana Giugliani¹, Angela Sitta², Carmen Regla Vargas^{3,4}, Luiz Carlos Santana da Silva⁵, Tatiele Nalin⁶, Maria Luiza Pereira^{3,7}, Roberto Giugliani^{1,3,8}, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{3,8}

¹ Postgraduation Program in Pediatrics and Adolescent Health, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

² Postgraduation Program in Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

³ Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil

⁴ Faculty of Pharmacy, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

⁵ Federal University of Para, Brazil

⁶ Postgraduation Program in Medicine: Medical Sciences, Porto Alegre, Brazil

⁷ Department of Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

⁸ Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Address for correspondence:

Roberto Giugliani
Medical Genetics Service
Hospital de Clinicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350
90035-903 – Porto Alegre – RS – Brazil
Phone: 55 51 3359-8011
Fax: 55 51 3359 8010
Email: rgiugliani@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Introduction: Hyperphenylalaninemia by phenylalanine hydroxylase deficiency (HPA-PAH) is an inborn error of metabolism in which increased serum levels of phenylalanine (Phe) occur. Recent studies on several populations showed that patients with HPA-PAH can have their Phe serum levels reduced when receiving oral tetrahydrobiopterin (BH₄). **Objective:** To identify in a sample of Brazilian HPA-PAH patients who are responsive to the oral administration of BH₄. **Methods:** The following inclusion criteria were used: Diagnosis of HPA-PAH, age ≥ 7 years, on dietary treatment, and Phe levels ≥ 6 mg/dL in all tests performed one year prior to the inclusion in this study. On the day before the BH₄ challenge (Day 1), three blood samples were obtained to measure Phe levels. Blood samples were also obtained at time points 0, 4, 8 hours (Day 2) and 24 h (Day 3) after the intake of the medication. Phe levels were determined by tandem mass spectrometry. Criteria used to define responsiveness to BH₄ were: Criterion 1: Phe reduction $\geq 30\%$ 8 hours after BH₄ administration, and Criterion 2: Phe reduction $\geq 30\%$ 24 hours after BH₄ administration. **Results:** A total of 18 patients with a mean age of 14 years were included in this study; of those, 66.7% were male. Eleven presented the classical form of the disease and 3, the atypical form. Three patients (classical form: 1, atypical form: 2) and five patients (classical form: 2; atypical form: 2; undefined form: 1) were considered responsive to BH₄ according to criteria 1 and 2, respectively. Phe serum levels on Day 1 did not show any change in the established time point schedule ($p=0.523$). However, significant variation was found ($p=0.006$) when levels of Phe between Days 1 and 2 were compared. The phenotype – genotype association analysis of patients with available data ($n=6$) showed that the association is multifactorial. **Conclusion:** In accordance with the literature, our findings show that many Brazilian patients with HPA-PAH can benefit from the oral administration of BH₄.

Key words: Phenylketonuria; PKU; tetrahydrobiopterin (BH₄); Responsiveness; BH₄; Phenylalanine; Chaperones

Introduction

Hyperphenylalaninemia by phenylalanine hydroxylase deficiency (HPA-PAH) is one of the most frequent inborn errors of metabolism and the first to be treated by dietary management [1]. Since the paper by Kure et al [2] reported the first HPA-PAH cases in which phenylalanine levels were reduced after BH₄ administration, several studies using different protocols and BH₄ doses have showed that HPA-PAH patients can obtain better control of their Phe by oral BH₄ [3-14]. It is clear that most patients responsive to BH₄ belong to the group with the diagnosis of “Atypical Phenylketonuria” (atypical PKU) and that 20 to 50% have > 30% reduction of blood Phe levels associated to the use of BH₄ [15]. The presence or absence of BH₄ responsiveness, usually defined by this criterion (reduction > 30% of Phe levels), is multifactorial and the genotype is one of its determining factors [15-20].

This study of HPA-PAH patients was carried out at the outpatient clinics of the Medical Genetics Service at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (ATDM-SGM/HCPA), Brazil. Its objective was to identify subjects responsive to BH₄ in a sample of Brazilian PKU patients.

Material and Methods

This study was approved by the HCPA Research Ethics Committee under number 07-553. All patients or their caregivers signed an informed consent form.

Patients

Patients included in this study were ≥ 7 years old, were on dietary treatment and had Phe serum levels ≥ 6 mg/dL in the 12 months prior to their inclusion. Exclusion criteria were the following: Pregnancy, liver disease, use of L-DOPA, Phe levels < 6

mg/dL in any test performed during the 12 months prior to their inclusion or irregular follow-up at the ATDM-SGM/HCPA in this period.

The classification of HPA-PAH types was based on the plasma Phe values at diagnosis, before any treatment (Classical PKU: Phe serum levels > 20 mg/dL; Atypical PKU: Phe serum levels between 6 – 20 mg/dL), and on the presence or absence of Phe serum levels > 20 mg/dL at least one month after Phe-restricted diet (presence: Classical PKU, absence: Atypical PKU). In order to be diagnosed as Classical PKU, patients should have Phe serum levels > 20 mg/dL at diagnosis and at least one Phe serum level > 20 mg/dL after treatment prescription; in order to be diagnosed as Atypical PKU the patients should have Phe serum levels <20 mg/dL at diagnosis and no Phe serum levels > 20 mg/dL after treatment prescription. Patients with unknown data were considered "Undefined PKU Type".

These criteria were used because the mean age at diagnosis made at the ATDM-SGM/HCPA is high (20.5 months). This could further increase Phe levels at diagnosis and could be a confusion bias for the classification of types of PKU. Furthermore, as there were several compliance problems (including failure to deliver the metabolic formula, which is a governmental function), Phe levels after treatment prescription could indicate the type of PKU (NALIN, 2008).

BH₄ loading test

Patients had to remain 2 days at the SGM/HCPA receiving their usual diet in order to undergo assessment. On the first day (pre BH₄) blood tests were performed at time points 8/12/16 or 9/13/17 (point 0/point 1/point 2, respectively) to assess Phe levels. On Day 2, a modified BH₄ loading test protocol [21] with a single dose of oral BH₄, 20 mg/kg of sapropterin dihydrochloride KUVAN® (Merck Serono). Blood sampling occurred at time points 0, 4, 8, and 24 hours (point 0 or baseline point, point 1, point 2,

and point 3, respectively) after taking the medication. Blood Phe levels were determined by tandem mass spectrometry (MS/MS) at the laboratory of inborn errors of metabolism at the SGM/HCPA. Assays were performed in duplicate and the average was used as the final result.

Patients were told to fast for at least 1 hour before blood samples were taken. If patients did not show Phe levels ≥ 6 mg/dL at point 0 of BH₄ load, they had to repeat this protocol later, and the initial test was not included in the study.

Responsiveness to BH₄

Clinical criteria to define responsiveness to BH₄ were: (a) **Criterion 1:** Phe reduction of $\geq 30\%$ 8 hours after its administration [15]; (b) **Criterion 2:** Phe reduction of $\geq 30\%$ 24 hours after its administration [21].

Dietary intake of Phe

All the patients were told to continue the same Phe diet prescribed before their inclusion in the study, i.e., their usual Phe-restricted diet. Phe intake was assessed by a 3-day diet survey applied on the day before patients came to the SGM/HCPA and everyday until and including the day of the BH₄ challenge. Daily Phe consumption was obtained using the *DietWin* Program, professional version 2008. The prescribed amount of Phe was assessed on patients' records and recorded on specific forms.

Statistical analysis

Data were recorded on an electronic spreadsheet using Microsoft® Excel. Statistic analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences, version 14.0 (SPSS® Inc, Chicago, IL). The descriptive analysis was performed using absolute and relative frequencies. Continuous variables were presented as mean \pm standard deviation and median with interquartile interval. The ANOVA test for repeated measures was used to compare Phe levels over time and to compare Phe consumption

during the 3 days of the diet survey. The Student's t-test for paired samples was used to compare Phe levels before and after BH₄ at any time point. The level of significance considered was 5%.

Results

Eighteen patients from 13 unrelated families were included in the study (**Figure 1**); 12 (66.7%) were male. Their median (interquartile interval) age was 14 years (11-21). Parental consanguinity was not reported.

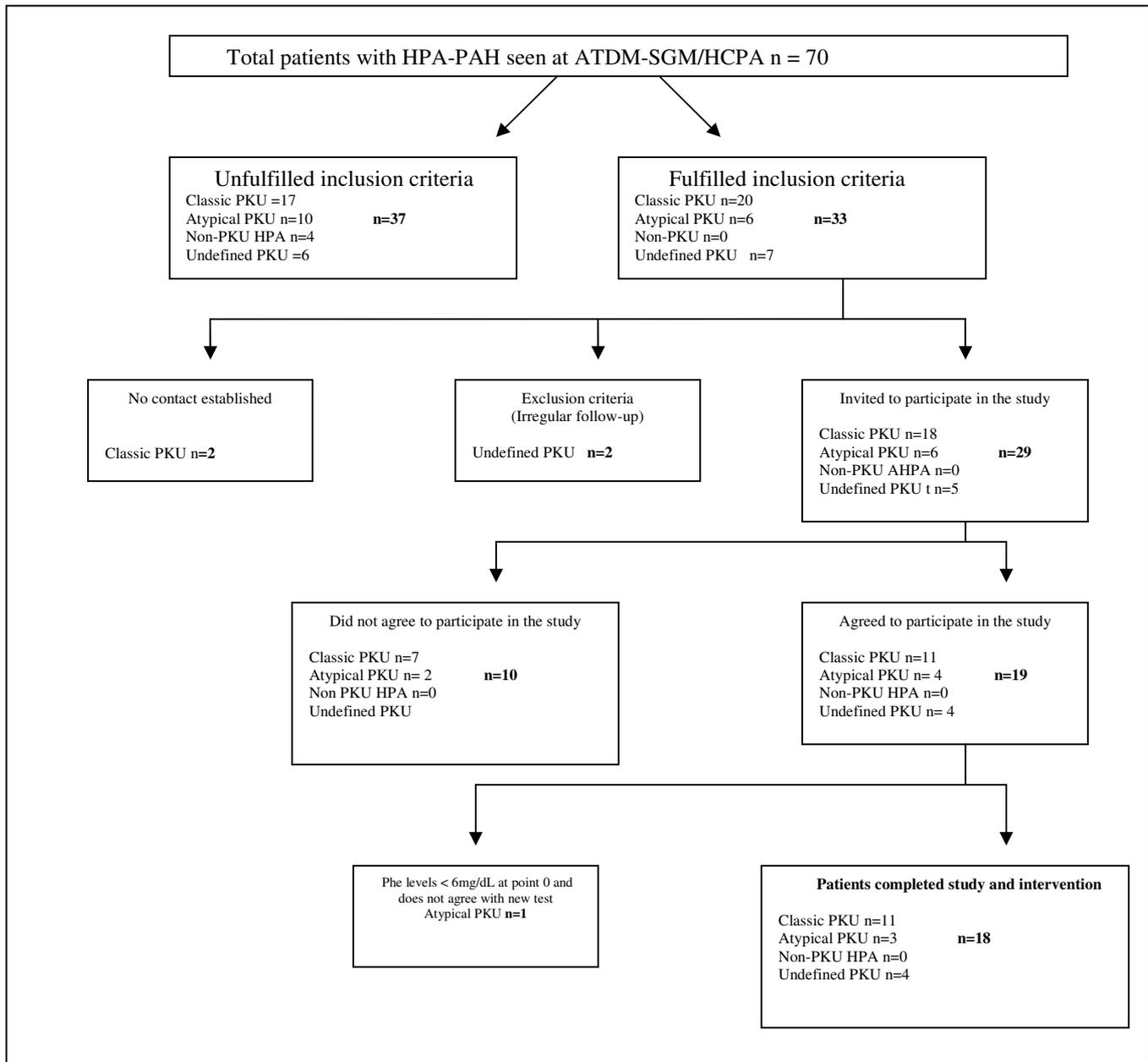


Figure 1 Sample selection algorithm used in this study

*Patients and / or their parents did not agree to participate in the study, saying they do not have availability of time and/or lack of interest in this research.

Phe levels and the percent reduction at time points after the administration of BH₄ are described in **Table 1**.

Table 1 Phenylalanine levels and percentage of reduction after 20mg/Kg of oral BH₄ in HPA-PAH seen at the metabolic disorders outpatient clinics of SGM/HCPA

Pat	Phenotype	Genotype		Phe Levels (mg/dL)				Phe reduction in comparison with point 0		
				Point 0	Point 1	Point 2	Point 3	Point 1	Point 2	Point 3
					(4h)	(8h)	(24h)	(4h)	(8h)	(24h)
		Allele 1	Allele 2							
1	Und PKU	nd	nd	10,5	9,4	9,3	7,9	-10,5	-11,4	-24,8
2	Cla PKU	p. I65T	p. R408W	9,8	7,3	7	6,7	-25,5	-28,6	-31,6
3	Aty PKU	nd	nd	6,5	4,9	5,8	4,7	-24,6	-10,8	-27,7
4	Cla PKU	nd	nd	13,9	12,3	11,5	11,6	-11,5	-17,3	-16,5
6	Cla PKU	p. V388M	IVS7nt1g>a	7,6	10,2	10	10,6	34,2	31,6	39,5
7	Aty PKU	nd	nd	6,2	4,1	3,4	3,2	-33,9	-45,2	-48,4
8	Und PKU	nd	nd	7	4,8	5,6	7,4	-31,4	-20,0	5,7
10	Aty PKU	nd	nd	8,7	5,3	5,3	3,6	-39,1	-39,1	-58,6
12	Cla PKU	p. I65T	IVS2+5G>C	12,6	11,7	10,2	12	-7,1	-19,0	-4,8
13	Cla PKU	nd	nd	8,7	7	7,9	7,1	-19,5	-9,2	-18,4
14	Cla PKU	p. R261Q	IVS12+1G>A	6,7	6,4	6,4	5,4	-4,5	-4,5	-19,4
16	Cla PKU	nd	nd	16	11,7	13,1	12,1	*	12,0	3,4
17	Cla PKU	p. R261Q	IVS12+1G>A	9,6	6,3	7,5	8,7	-34,4	-21,9	-9,4
19	Und PKU	nd	nd	15,1	10,6	14,5	14,1	-29,8	-4,0	-6,6
20	Und PKU	nd	nd	13	9,6	11,1	8,6	-26,2	-14,6	-33,8
21	Cla PKU	nd	nd	12	8	8,9	10,2	-33,3	-25,8	-15,0
22	Cla PKU	p. I65T	p. R261X	7,7	6,2	6,9	8,7	-19,5	-10,4	13,0
23	Cla PKU	nd	nd	6,2	3,5	4,2	3,3	-43,5	-32,3	-46,8

*Data not available; nd, not determined; Cla PKU, Classical PKU; Aty PKU, Atypical PKU; Und PKU, Undefined PKU; Phe, phenylalanine

Siblings: patients 1 e 20; 4, 16 and 21; 7 and 8; 14 and 17

Patients considered responsive: 7, 10 and 23 (criterion 1) and patients 2, 7, 10, 20 and 23 (criterion 2)

Patient's classification according to PKU type and responsiveness to BH₄ is shown in **Table 2**.

Regarding the diet, there was no difference in the Phe consumption assessed during the 3 days of the dietary survey ($p=0.059$). Phe levels on the day before the BH₄ loading test did not vary at the blood draw time points ($p=0.523$). When comparing Phe at baseline time points before and after BH₄ challenge ($9.44\pm 3.12\text{mg/dL}$ and $9.56\pm 3.09\text{mg/dL}$, respectively) no significant differences were found ($p=0.795$). At point 1, mean Phe values were $8.88\pm 2.77\text{mg/dL}$ and $7.73\pm 2.79\text{mg/dL}$ on the day before and after the BH₄, respectively, and the difference was significant ($p=0.025$). At point 2, mean Phe values were $9.09\pm 3.24\text{mg/dL}$ and $8.07\pm 2.84\text{mg/dL}$ on the day before and after the BH₄ challenge, respectively, with significant difference ($p=0.006$).

Regarding the genotype, the 2 mutated alleles on the PAH gene had only been determined in 6 patients (**Tables 1 and 3**). The comparison between the results of this study and the results available in the literature (**Table 3**) underlines the multifactorial character of responsiveness to BH₄. Additionally, the analysis of the 3 pairs of siblings (patients 1 and 20; patients 7 and 8; patients 14 and 17) showed that only one of the pairs of siblings showed concordance regarding the presence/absence of responsiveness to BH₄.

Table 2. PKU Type and Responsiveness to BH₄ according to criterion 1 and 2: Result of this sample (n=18).

	PKU Type			Total
	Classical PKU	Atypical PKU	Undefined PKU	
Criterion 1				
Responsive BH ₄	1	2	0	3
Non-Responsive BH ₄	10	1	4	15
Criterion 2				
Responsive BH ₄	2	2	1	5
Non-Responsive BH ₄	9	1	3	13

* Criterion 1: Phe reduction $\geq 30\%$ 8 hours after BH₄ administration; Criterion 2: Phe reduction $\geq 30\%$ 24h after BH₄ administration.

Table 3 – Responsiveness to BH₄: genotype-phenotype association in a sample of Brazilian patients compared to literature data

Patients	Genotype		Phenotype	Resp. to BH ₄ ^a	Resp. to BH ₄ according to genotype in literature ^b (number of patients described)	resp. to BH ₄ according to phenotype in literature ^b (number of patients described)
	Allele 1	Allele 2				
2	p. I65T	p. R408W	Cla PKU	Yes	Yes (1 patient)	Aty PKU (2 patients)
6	p. V388M	IVS71G>A	Cla PKU	No	nd	nd
12	p. I65T	IVS2+5G>C	Cla PKU	No	nd	nd
14	p. R261Q	IVS12+1G>A	Cla PKU	No	nd	nd
17	p. R261Q	IVS12+1G>A	Cla PKU	No	nd	nd
22	p. I65T	p. R261X	Cla PKU	No	No (1 patient) Yes (1 patient)	Cla PKU (2 patients)

Cla PKU, Classic PKU; Aty PKU, Atypical PKU, Resp, Responsiveness; nd, not determined

* Patients 14 and 17 are siblings

^a Patients showed concordance in responsiveness criteria, i.e., the responsive patient had a 30% reduction in Phe levels 24 h after BH₄ administration and the non-responsive ones had reduction in both points.

^b Data from BIOPKUdb <http://www.bh4.org/BH4DatabasesBiopku.asp>

Discussion

This is the first study of Brazilian HPA-PAH patients which aimed to identify patients responsive to oral BH₄. Inclusion criteria aimed to select the most collaborative patients (hence the cutoff point at the age of 7) and patients with less adherence to treatment (hence the cutoff point at 6 mg/dL for previous Phe levels). Moreover, the protocol used did not foresee the use of Phe load, which excluded the possibility of inclusion of patients with adequate levels of Phe). Thus, most patients included belonged to the Classical PKU group.

Phe levels on the day before the BH₄ loading test did not show variation at time points. However, the comparison between Phe levels at time points before and after BH₄ challenge showed a significant difference, thus underlining the hypothesis that the variation of Phe levels before and after BH₄ are really caused by BH₄.

Patient responsiveness rate to BH₄ varied according to the criteria used to define responsiveness, being higher under criterion 2 (reduction $\geq 30\%$ 24 hours after medicine administration). When comparing data adapted to 8 and 24 hours, one observes that the longer the test duration, the higher the possibility of detection of slow responders [15, 21]. According to the literature, the cutoff point used to define responsiveness to BH₄ may vary according to the patient's clinical phenotype, being smaller in Classical PKU (Phe levels reduction $>20\%$) and greater in Atypical PKU patients (Phe level reduction $\geq 30\%$) [4]. When comparing the PKU types of patients responding to BH₄ with the two criteria of responsiveness to the drug, one sees that patients with Classical PKU increased their responsiveness rate over time (from 1 to 2 patients, respectively). However, the responsiveness rate of patients with Atypical PKU remained unchanged (2 patients in both protocols).

Our findings agree with the literature. Clinically significant reduction of Phe levels in response to oral BH₄ is normally seen in about 50% of Atypical PKU patients [15]. Decrease in Phe levels is higher in patients with milder PKU phenotypes when compared to more severe phenotypes, because the residual PAH activity is higher in the milder disease types [23, 24]. The results of this study showed that Classical PKU patients can also be responsive to the test. As reported in the literature, less than 10% of patients responsive to BH₄ belong to the Classical PKU group [15]. This happens because they have low or even absent PAH residual activity. However, it is possible that patients classified as non-responsive in the protocol used in this study would be responsive if tested later. According to clinical studies, a long time span, such as 48 hours, is essential to detect slow responders [3, 25, 26]. In their study, Fiege and Blau [4] observed that a high number of Classical PKU patients responded to the BH₄ loading test, especially when the cutoff point was reduced from 30% to 20% (6.8% to 26%).

There is no consensus on a gold standard protocol to diagnose BH₄ responsiveness. Several authors used different protocols using both the non-registered formula of BH₄ and sapropterin dihydrochloride (synthetic form) [9, 28, 29]. These studies also included a diet with normal or restricted Phe as well as, for instance, different BH₄ doses and different time points to assess Phe levels [21].

It is difficult to compare results from different studies, but a reduction in Phe levels of at least 30% is generally considered to be a clinically significant response to treatment. However, it is important to point out that this threshold is arbitrary [15]. A new study was recently undertaken in Europe in order to obtain a better understanding of diagnostic and therapeutic practices in HPA-PAH; Blau et al [35] established a questionnaire with 33 questions sent to 243 professionals from 165 PKU centers in 23

European countries. One hundred and one questionnaires were returned by 93/165 centers (56%) from 19/23 European countries (83%). Information obtained from that survey showed that the BH₄ loading test is routinely used in 54% of the PKU centers; 61% of those centers administer a single dose of BH₄ (20mg/Kg). When asked about the definition of BH₄ responsiveness, 34% answered that it is a $\geq 30\%$ reduction of Phe levels after 24 hours; 17% and 12%, respectively, defined it as a $\geq 30\%$ reduction in Phe levels at any time point and 8 hours after the administration of the drug. Regarding the definition of severity of PAH deficiency, more than 70% of respondents classified classical PKU as an untreated Phe concentration >20 mg/dL. However, the definitions reported for moderate and mild PKU and mild HPA varied considerably not only between countries but also between centers within one country. This finding may indicate that respondents had difficulty in defining or interpreting the question. There appears to be a need for a common definition for classification. This is important for the decision of treatment also depends on the definition of mild HPA and mild PKU. It is necessary to standardize a single, simple, and universal test that makes the identification of BH₄ responders easier. This should simplify the definition of the BH₄ dose to be administered, the Phe intake, and standardized blood sampling time points, thus restricting the number of Phe measurements and defining a gold standard to interpret responsiveness to the drug.

Pre-established inclusion criteria for the present study excluded from the test approximately 50% of patients seen at the ADTM. Additional studies applying different protocols will be conducted in order to increase the sample size and to allow the inclusion of patients not yet tested. Patients identified as responsive shall go on receiving their usual treatment until BH₄ is available in Brazil [12].

Acknowledgements

The authors thank Merck Serono for donating the medication Kuvan® used in this study. We also thank Juarez Huve, Cristina Netto, Carolina Fischinger M. de Souza, Lilia Farret Refosco, the HCPA Casa de Apoio, and the whole team of the HCPA Medical Genetics Service for their support and collaboration. This study was supported by the FIPE/HCPA (project n. 07-553) and CNPq (the Brazilian Council of Scientific Development and Research).

References

- [1] J.C. Coelho, M. Wajner, M.G. Burin, C.R. Vargas, R. Giugliani, Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism *Eur J Pediatr* 156 (1997) 650-654.
- [2] S. Kure, D.C. Hou, T. Ohura, H. Iwamoto, S. Suzuki, N. Sugiyama, O. Sakamoto, K. Fujii, Y. Matsubara, K. Narisawa, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *J Pediatr* 135 (1999) 375-378.
- [3] B. Fiege, L. Bonafe, D. Ballhausen, M. Baumgartner, B. Thony, D. Meili, L. Fiori, M. Giovannini, N. Blau, Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S91-95.
- [4] B. Fiege, N. Blau, Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria *J Pediatr* 150 (2007) 627-630.
- [5] H.L. Levy, A. Milanowski, A. Chakrapani, M. Cleary, P. Lee, F.K. Trefz, C.B. Whitley, F. Feillet, A.S. Feigenbaum, J.D. Bebhuk, H. Christ-Schmidt, A. Dorenbaum, Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study *Lancet* 370 (2007) 504-510.
- [6] R. Matalon, R. Koch, K. Michals-Matalon, K. Moseley, S. Surendran, S. Tyring, H. Erlandsen, A. Gamez, R.C. Stevens, A. Romstad, L.B. Moller, F. Guttler, Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *Genet Med* 6 (2004) 27-32.
- [7] R. Matalon, K. Michals-Matalon, R. Koch, J. Grady, S. Tyring, R.C. Stevens, Response of patients with phenylketonuria in the US to tetrahydrobiopterin *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S17-21.
- [8] K. Michals-Matalon, G. Bhatia, F. Guttler, S.K. Tyring, R. Matalon, Response of phenylketonuria to tetrahydrobiopterin *J Nutr* 137 (2007) 1564S-1567S; discussion 1573S-1575S.
- [9] B.K. Burton, D.K. Grange, A. Milanowski, G. Vockley, F. Feillet, E.A. Crombez, V. Abadie, C.O. Harding, S. Cederbaum, D. Dobbelaere, A. Smith, A.

Dorenbaum, The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study *J Inher Metab Dis* 30 (2007) 700-707.

[10] P. Lee, E.P. Treacy, E. Crombez, M. Wasserstein, L. Waber, J. Wolff, U. Wendel, A. Dorenbaum, J. Bebhuk, H. Christ-Schmidt, M. Seashore, M. Giovannini, B.K. Burton, A.A. Morris, Safety and efficacy of 22 weeks of treatment with sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria *Am J Med Genet A* 146A (2008) 2851-2859.

[11] K. Michals-Matalon, Sapropterin dihydrochloride, 6-R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, in the treatment of phenylketonuria *Expert Opin Investig Drugs* 17 (2008) 245-251.

[12] A. Muntau, S. Gersting, Treatment of patients with tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, in: N. Blau (Ed.), *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*, SPS Verlagsgesellschaft, Heilbronn, 2006, pp. 401-433.

[13] F.K. Trefz, B.K. Burton, N. Longo, M.M. Casanova, D.J. Gruskin, A. Dorenbaum, E.D. Kakkis, E.A. Crombez, D.K. Grange, P. Harmatz, M.H. Lipson, A. Milanowski, L.M. Randolph, J. Vockley, C.B. Whitley, J.A. Wolff, J. Bebhuk, H. Christ-Schmidt, J.B. Hennermann, Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study *J Pediatr* 154 (2009) 700-707.

[14] F.K. Trefz, D. Scheible, G. Frauendienst-Egger, H. Korall, N. Blau, Long-term treatment of patients with mild and classical phenylketonuria by tetrahydrobiopterin *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S75-80.

[15] N. Blau, A. Belanger-Quintana, M. Demirkol, F. Feillet, M. Giovannini, A. MacDonald, F.K. Trefz, F.J. van Spronsen, Optimizing the use of sapropterin (BH(4)) in the management of phenylketonuria *Mol Genet Metab* 96 (2009) 158-163.

[16] M.R. Zurfluh, J. Zschocke, M. Lindner, F. Feillet, C. Chery, A. Burlina, R.C. Stevens, B. Thony, N. Blau, Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *Hum Mutat* 29 (2008) 167-175.

[17] H. Erlandsen, Molecular mechanism of tetrahydrobiopterin-responsiveness, in: N. Blau (Ed.), *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*, SPS Verlagsgesellschaft, Heilbronn, 2006, pp. 376-400.

[18] N. Blau, H. Erlandsen, The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *Mol Genet Metab* 82 (2004) 101-111.

[19] B. Thöny, Tetrahydrobiopterin and its functions, in: N. Blau (Ed.), *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*, SPS Verlagsgesellschaft, Heilbronn, 2006, pp. 503-554.

[20] P. Guldborg, F. Rey, J. Zschocke, V. Romano, B. Francois, L. Michiels, K. Ullrich, G.F. Hoffmann, P. Burgard, H. Schmidt, C. Meli, E. Riva, I. Dianzani, A. Ponzzone, J. Rey, F. Guttler, A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype *Am J Hum Genet* 63 (1998) 71-79.

[21] N. Blau, Defining tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness in PKU *J Inher Metab Dis* 31 (2008) 2-3.

[22] A. Baldellou Vazquez, M.I. Salazar Garcia-Blanco, M.P. Ruiz-Echarri Zalaya, C. Campos Calleja, L. Ruiz Desviat, M. Ugarte Perez, [Tetrahydrobiopterin therapy

for hyperphenylalaninemia due to phenylalanine hydroxylase deficiency. When and how?'] *An Pediatr (Barc)* 64 (2006) 146-152.

[23] B. Perez-Duenas, M.A. Vilaseca, A. Mas, N. Lambruschini, R. Artuch, L. Gomez, J. Pineda, A. Gutierrez, M. Mila, J. Campistol, Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria *Clin Biochem* 37 (2004) 1083-1090.

[24] M.D. Boveda, M.L. Couce, D.E. Castineiras, J.A. Cocho, B. Perez, M. Ugarte, J.M. Fraga, The tetrahydrobiopterin loading test in 36 patients with hyperphenylalaninaemia: evaluation of response and subsequent treatment *J Inherit Metab Dis* 30 (2007) 812.

[25] A. Belanger-Quintana, M.J. Garcia, M. Castro, L.R. Desviat, B. Perez, B. Mejia, M. Ugarte, M. Martinez-Pardo, Spanish BH4-responsive phenylalanine hydroxylase-deficient patients: evolution of seven patients on long-term treatment with tetrahydrobiopterin *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S61-66.

[26] J.B. Hennermann, C. Buhner, N. Blau, B. Vetter, E. Monch, Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S86-90.

[27] A.C. Muntau, W. Roschinger, M. Habich, H. Demmelmair, B. Hoffmann, C.P. Sommerhoff, A.A. Roscher, Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria *N Engl J Med* 347 (2002) 2122-2132.

[28] H. Levy, B. Burton, S. Cederbaum, C. Scriver, Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH(4)) in phenylketonuria and its use in treatment *Mol Genet Metab* 92 (2007) 287-291.

[29] U. Langenbeck, Classifying tetrahydrobiopterin responsiveness in the hyperphenylalaninaemias *J Inherit Metab Dis* 31 (2008) 67-72.

[30] H. Shintaku, S. Kure, T. Ohura, Y. Okano, M. Ohwada, N. Sugiyama, N. Sakura, I. Yoshida, M. Yoshino, Y. Matsubara, K. Suzuki, K. Aoki, T. Kitagawa, Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene *Pediatr Res* 55 (2004) 425-430.

[31] J.J. Mitchell, B. Wilcken, I. Alexander, C. Ellaway, H. O'Grady, V. Wiley, J. Earl, J. Christodoulou, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria: the New South Wales experience *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S81-85.

[32] C. Bernegger, N. Blau, High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002 *Mol Genet Metab* 77 (2002) 304-313.

[33] U. Lassker, J. Zschocke, N. Blau, R. Santer, Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria. Two new cases and a review of molecular genetic findings *J Inherit Metab Dis* 25 (2002) 65-70.

[34] L.R. Desviat, B. Perez, A. Belanger-Quintana, M. Castro, C. Aguado, A. Sanchez, M.J. Garcia, M. Martinez-Pardo, M. Ugarte, Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype *Mol Genet Metab* 83 (2004) 157-162.

[35] N. Blau, A. Belanger-Quintana, M. Demirkol, F. Feillet, M. Giovannini, A. Macdonald, F.K. Trefz, F.V. Spronsen, Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries *Mol Genet Metab* (2009).

8. ARTIGO EM PORTUGUÊS

Responsividade à tetrahydrobiopterina em pacientes brasileiros com deficiência de fenilalanina hidroxilase

Luciana Giugliani¹, Angela Sitta², Carmen Regla Vargas^{3,4}, Luiz Carlos Santana da Silva⁵, Tatiele Nalin⁶, Maria Luiza Pereira^{3,7}, Roberto Giugliani^{1,3,8}, Ida Vanessa Doederlein Schwartz^{3,7}

¹ Programa de Pós-Graduação na Saúde da Criança e do Adolescente, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

³ Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, Brasil

⁴ Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

⁵ Universidade Federal do Para, Brasil

⁶ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

⁷ Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

⁸ Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Correspondência para autor:

Roberto Giugliani
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350
90035-903 – Porto Alegre – RS – Brasil
Tel + 55 51 3359-8011
Fax + 55 51 3359 8010
Email: rgiugliani@hcpa.ufrgs.br

Resumo

Introdução: A Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase (HPA-PAH) é um erro inato do metabolismo no qual ocorre aumento dos níveis séricos de fenilalanina (Phe). Estudos recentes, realizados em várias populações, demonstraram que pacientes com HPA-PAH podem apresentar redução das concentrações plasmáticas de Phe mediante a administração oral de tetrahydrobiopterina (BH₄). **Objetivo:** Identificar em uma amostra de pacientes brasileiros com HPA-PAH aqueles que são responsivos à administração de BH₄ por via oral. **Métodos:** Para um paciente ser incluído no estudo, era necessário ter diagnóstico de HPA-PAH e idade igual ou superior a 7 anos, estar em tratamento dietético e apresentar nível de Phe igual ou superior a 6 mg/dL em todas as medidas realizadas no ano anterior à inclusão no estudo. No dia anterior à sobrecarga de BH₄ (Dia 1), os pacientes foram submetidos a três coletas de sangue para mensuração dos níveis de Phe. No Dia 2, os pacientes receberam dose única de 20mg/Kg de BH₄. As coletas de sangue foram, então, realizadas nos pontos de hora: 0, 4 e 8h (Dia 2) e 24h (Dias 3) após a ingestão do medicamento. Os níveis de Phe foram determinados através da espectrometria de massa *in tandem*. Foram utilizados dois critérios para definir a presença de responsividade ao BH₄: **Critério 1:** redução $\geq 30\%$ de Phe após 8h da administração do medicamento; **Critério 2:** redução $\geq 30\%$ de Phe após 24h da administração do medicamento. **Resultados:** Dezoito pacientes foram incluídos no estudo, com mediana de idade de 14 anos, sendo 66,7% do sexo masculino. Onze apresentavam a forma clássica da doença e três a forma atípica. Três (forma clássica: 1, forma atípica: 2) e cinco (forma clássica: 2, forma atípica: 2 e forma não-definida: 1) pacientes foram considerados responsivos ao BH₄ conforme critérios 1 e 2, respectivamente. Os níveis de Phe plasmáticos do dia anterior ao teste de sobrecarga não demonstraram variação nos pontos de hora ($p=0,523$). Entretanto, quando comparamos os níveis de Phe nos pontos de hora do dia pré e pós BH₄, encontrou-se variação significativa entre eles ($p=0,006$). A análise da associação genótipo-fenótipo, para os pacientes com dados disponíveis ($n=6$) mostrou que a mesma é multifatorial. **Conclusão:** Nossos achados estão de acordo com a literatura, e indicaram que um número considerável de pacientes brasileiros com HPA-PAH poderá ser beneficiado com a administração oral de BH₄.

Palavras-chave: Fenilcetonúria; PKU; Tetrahydrobiopterina (BH₄); Responsividade ao BH₄; Fenilalanina; Chaperonas.

Introdução

A hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase (HPA-PAH) é um dos erros inatos do metabolismo mais frequentes, e o primeiro a ser tratado por manejo dietético [1]. Desde a publicação de Kure et al. [2], que relatou os primeiros pacientes com HPA-PAH cujos níveis de fenilalanina (Phe) diminuíram com a utilização de BH₄, numerosos estudos, usando protocolos diferentes e doses variadas de BH₄, demonstraram que pacientes com HPA-PAH podem ter os seus níveis de Phe melhor controlados mediante a administração oral de BH₄ [3-14]. A partir desses estudos, fica evidente que a maioria dos indivíduos responsivos ao BH₄ pertence ao grupo com “Fenilcetonúria Atípica” (PKU atípica) e que cerca de 20 a 50% dos pacientes com PKU alcançam redução > 30% dos níveis de Phe no sangue associada ao uso de BH₄ [15]. A presença ou ausência de responsividade ao BH₄, usualmente definida por tal critério (redução > 30% dos níveis de Phe) é multifatorial, sendo o genótipo um dos seus fatores determinantes [15-20].

Este estudo foi realizado em pacientes com HPA-PAH em tratamento dietético no Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ATDM-SGM/HCPA, Brasil), com o objetivo de identificar indivíduos responsivos ao BH₄ em uma amostra de pacientes brasileiros com fenilacetônúria.

Material e métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (número 07-553). Todos os pacientes e/ou seus responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Pacientes

Foram incluídos no estudo pacientes com idade ≥ 7 anos e que possuíam níveis séricos de Phe ≥ 6 mg/dL nos 12 meses de vida à data de inclusão no estudo. Os critérios de exclusão foram: pacientes grávidas, pacientes com envolvimento hepático clínico, pacientes em uso de levodopa, pacientes com nível de Phe < 6 mg/dL em alguma das análises realizadas nos 12 meses anteriores à sua inclusão no estudo e pacientes com seguimento irregular no ATDM-SGM/HCPA nesses mesmos 12 meses.

A classificação do tipo de HPA-PAH dos pacientes baseou-se no valor da Phe plasmática ao diagnóstico (sem tratamento) (PKU Clássica: Phe > 20 mg/dL ao diagnóstico; PKU Atípica: Phe entre 6 – 20 mg/dL ao diagnóstico; HPA Não-PKU: Phe entre 2 – 6 mg/dL ao diagnóstico) e na presença ou não de algum valor de Phe > 20 mg/dL pelo um mês após prescrição de dieta restrita em Phe (presença: PKU Clássica, ausência: PKU Atípica). Para ser diagnosticado como PKU Clássica, os pacientes deveriam ter Phe ao diagnóstico > 20 mg/dL e pelo menos algum valor de Phe > 20 mg/dL após prescrição do tratamento; Os demais casos, assim como aquele para ser diagnosticado como PKU atípica, os pacientes deveriam ter Phe ao diagnóstico < 20 mg/dL e nenhum valor de Phe > 20 mg/dL após prescrição do tratamento. Aqueles com dados não-conhecidos, foram considerados "PKU tipo não-definido". Estes critérios foram utilizados porque a média de idade ao diagnóstico dos pacientes do ATDM-SGM/HCPA é alta (20,5 meses), o que poderia elevar os níveis de Phe ao diagnóstico, sendo um viés de confusão para a classificação do tipo de PKU. Além disso, como existiam vários problemas em relação à adesão ao tratamento (inclusive falhas no fornecimento da fórmula metabólica aos pacientes, o que é uma função governamental), os níveis de Phe durante o tratamento poderiam ser indicativos do tipo de PKU do paciente (NALIN,2008).

Teste de sobrecarga com BH₄

Os pacientes foram instruídos a permanecer dois dias no SGM/HCPA, recebendo dieta habitual, para a realização das avaliações. No primeiro dia (dia pré-BH₄), os pacientes foram submetidos a coletas de sangue nos pontos de hora 8/12/16h ou 9/13/17h (ponto 0/ponto 1/ponto 2, respectivamente), para medida da Phe. No segundo dia, foi aplicado um protocolo modificado do teste de sobrecarga com BH₄ [21] com administração oral de uma única dose de 20 mg/Kg de BH₄ (sapropterina dihidrocloride, KUVAN®) (Laboratório Merck Serono). As coletas de sangue foram realizadas nos pontos de hora: 0, 4, 8 e 24h (ponto 0 ou basal, ponto 1, ponto 2 e ponto 3, respectivamente) após a ingestão do medicamento. Os níveis de Phe no sangue foram determinados através da espectrometria de massa *in tandem* (MS/MS) no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do SGM/HCPA. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas, sendo a média entre as duas dosagens considerada como resultado final.

Os pacientes foram instruídos a permanecer em jejum por pelo menos uma hora antes de todas as coletas de sangue. Caso algum dos pacientes não apresentasse níveis de Phe ≥ 6 mg/dL no ponto 0 do dia da sobrecarga com BH₄, o mesmo seria instruído a repetir este protocolo em momento posterior, e o teste inicial não era considerado.

Responsividade ao BH₄

Foram utilizados dois critérios para definição da responsividade ao BH₄: (a)

Critério 1: redução $\geq 30\%$ de Phe após 8h da administração do medicamento[15]; (b)

Critério 2: redução $\geq 30\%$ de Phe após 24h da administração do medicamento[21].

Consumo dietético de Phe

Todos os pacientes foram instruídos a continuar a mesma prescrição dietética de Phe em que estavam antes do início do estudo (ou seja, dieta usual restrita em Phe). O consumo de Phe ao longo do estudo foi verificado por meio de inquérito alimentar de 3 dias, que foi aplicado do dia anterior a vinda dos pacientes ao SGM/HCPA até o dia da sobrecarga com o BH₄ inclusive. O consumo de Phe foi obtido através do cálculo do inquérito alimentar de cada dia utilizando o programa de apoio a nutrição *DietWin* versão Profissional – 2008. A quantidade de Phe prescrita foi verificada no prontuário do paciente e registrada em formulário específico.

Análise estatística

As informações foram digitadas em planilha eletrônica utilizando o programa *Microsoft® Excel*. A análise estatística foi realizada através do Programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 14.0 (SPSS® Inc, Chicago, IL). A análise descritiva foi realizada com o fornecimento das frequências absolutas e relativas. As variáveis contínuas foram apresentadas como médias \pm desvio padrão e mediana com intervalo interquartil. O teste ANOVA para medidas repetidas foi utilizado para comparar os níveis de Phe ao longo do tempo, assim como para comparar o consumo de Phe ao longo dos três dias de inquérito alimentar. O teste t de Student para amostra pareadas foi utilizado para comparar os níveis de Phe pré e pós BH₄, em cada ponto de hora. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Dezoito pacientes, oriundos de 13 famílias não-relacionadas, foram incluídos no estudo (**Figura 1**), sendo 12 (66,7%) do sexo masculino. A mediana (intervalo interquartil) de idade dos pacientes foi de 14 (11 - 21) anos. Consangüinidade parental

não foi relatada. Os dados de genótipo e de variabilidade intrafamiliar, embora limitados pelo pequeno tamanho amostral, estão de acordo com o caráter multifatorial da responsividade ao BH₄.

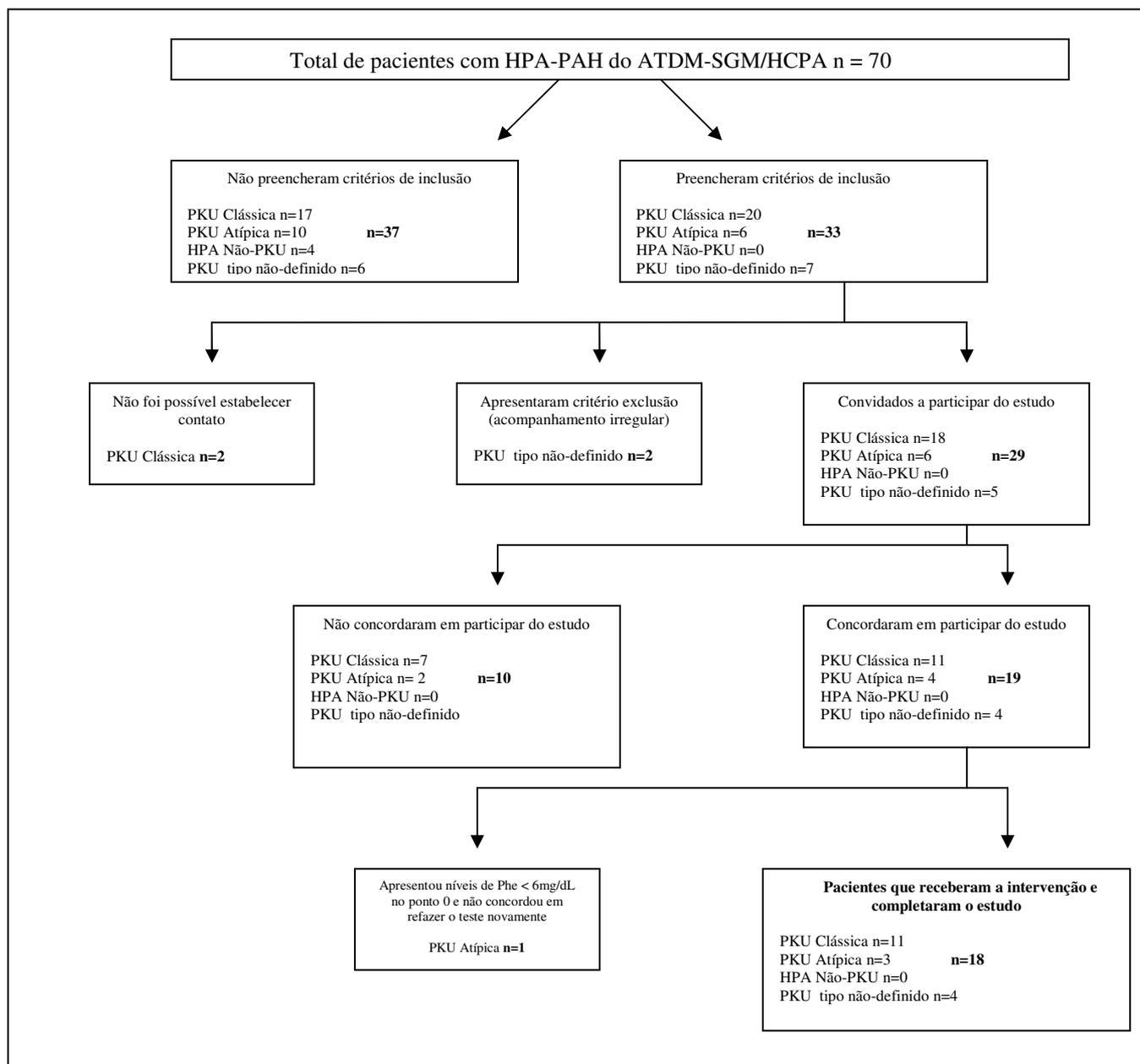


Figura 1 Algoritmo da seleção da amostra do presente estudo

* Os pacientes e/ou seus responsáveis não concordaram em participar do estudo alegando não ter disponibilidade de tempo (ausência no trabalho/escola) e/ou falta de interesse na pesquisa.

Os valores de Phe plasmática e a porcentagem de redução nos ponto de hora após administração do BH₄ estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 Níveis de fenilalanina plasmática e porcentagem de redução após a administração oral de 20 mg/Kg BH₄ em pacientes com HPA por deficiência de PAH do ambulatório de tratamento de distúrbios metabólicos do SGM/HCPA.

Pac	Fenótipo	Genótipo		Níveis de Phe (mg/dL)				Redução de Phe em comparação com ponto 0		
				Ponto 0	Ponto 1 (4h)	Ponto 2 (8h)	Ponto 3 (24h)	Ponto 1 (4h)	Ponto 2 (8h)	Ponto 3 (24h)
				Alelo 1	Alelo 2					
1	PKU Ind	nd	nd	10,5	9,4	9,3	7,9	-10,5	-11,4	-24,8
2	PKU Cla	p. I65T	p. R408W	9,8	7,3	7	6,7	-25,5	-28,6	-31,6
3	PKU Ati	nd	nd	6,5	4,9	5,8	4,7	-24,6	-10,8	-27,7
4	PKU Cla	nd	nd	13,9	12,3	11,5	11,6	-11,5	-17,3	-16,5
6	PKU Cla	p. V388M	IVS7nt1g>a	7,6	10,2	10	10,6	34,2	31,6	39,5
7	PKU Atip	nd	nd	6,2	4,1	3,4	3,2	-33,9	-45,2	-48,4
8	PKU Ind	nd	nd	7	4,8	5,6	7,4	-31,4	-20,0	5,7
10	PKU Atip	nd	nd	8,7	5,3	5,3	3,6	-39,1	-39,1	-58,6
12	PKU Cla	p. I65T	IVS2+5G>C	12,6	11,7	10,2	12	-7,1	-19,0	-4,8
13	PKU Cla	nd	nd	8,7	7	7,9	7,1	-19,5	-9,2	-18,4
14	PKU Cla	p. R261Q	IVS12+1G>A	6,7	6,4	6,4	5,4	-4,5	-4,5	-19,4
16	PKU Cla	nd	nd	16	11,7	13,1	12,1	*	12,0	3,4
17	PKU Cla	p. R261Q	IVS12+1G>A	9,6	6,3	7,5	8,7	-34,4	-21,9	-9,4
19	PKU Ind	nd	nd	15,1	10,6	14,5	14,1	-29,8	-4,0	-6,6
20	PKU Ind	nd	nd	13	9,6	11,1	8,6	-26,2	-14,6	-33,8
21	PKU Cla	nd	nd	12	8	8,9	10,2	-33,3	-25,8	-15,0
22	PKU Cla	p. I65T	p. R261X	7,7	6,2	6,9	8,7	-19,5	-10,4	13,0
23	PKU Cla	nd	nd	6,2	3,5	4,2	3,3	-43,5	-32,3	-46,8

*Dados não disponíveis; nd, not determined; PKU Cla, PKU Clássica; PKU Atip, PKU Atípica; PKU Ind, PKU Indefinido; Phe, fenilalanina

Pacientes irmãos: 1 e 20; 4,16 e 21; 7 e 8; 14 e 17

Foram considerados responsivos os pacientes 7,10 e 23 (critério 1) e pacientes 2,7,10,20 e 23 (critério 2)

A classificação dos pacientes de acordo com o tipo de PKU e com a responsividade ao BH₄ está ilustrada nas **Tabela 2**.

Em relação aos dados dietéticos, não houve diferença entre o consumo de Phe avaliado nos três dias do inquérito alimentar ($p=0,059$). Os níveis plasmáticos de Phe do dia anterior ao do teste de sobrecarga com BH₄ não demonstraram variação nos pontos de hora de coleta ($p=0,523$). Quando comparamos os níveis de Phe dos pontos de hora basais dos dias pré e pós BH₄ ($9,44\pm 3,12\text{mg/dL}$ e $9,56\pm 3,09\text{mg/dL}$, respectivamente), não encontramos diferença significativa ($p=0,795$). Em relação ao ponto 1, as médias dos valores de Phe foram $8,88\pm 2,77\text{mg/dL}$ e $7,73\pm 2,79\text{mg/dL}$ nos dias pré e pós BH₄ respectivamente, havendo diferença significativa entre eles ($p=0,025$). No ponto 2, a média dos valores de Phe foram $9,09\pm 3,24\text{mg/dL}$ e $8,07\pm 2,84\text{mg/dL}$ nos dias pré e pós BH₄, respectivamente, havendo diferença significativamente entre eles ($p=0,006$).

Em relação ao genótipo, os dois alelos mutantes do gene *PAH* foi identificado em apenas 6 pacientes (**Tabelas 1 e 3**). A comparação dos resultados obtidos com aqueles descritos na literatura (Tabela 2) reforça o caráter multifatorial da responsividade ao BH₄. Além disso, considerando as três duplas de irmãos (pacientes 1 e 20; pacientes 7 e 8; e pacientes 14 e 17) e o trio de irmãos (pacientes 4,16 e 21) incluídos no estudo, somente uma dupla de irmãos (pacientes 14 e 17) e o trio de irmãos apresentou concordância em relação à presença/ausência de responsividade ao BH₄.

Tabela 2. Tipo de PKU e Responsividade ao BH₄ de acordo com o critério 1 e 2: Resultados da amostra (n=18).

	Tipo PKU			Total
	PKU Clássica	PKU Atípica	PKU	
Critério 1				
Responsivo ao BH ₄	1	2	0	3
Não Responsivo BH ₄	10	1	4	15
Critério 2				
Responsivo ao BH ₄	2	2	1	5
Não Responsivo BH ₄	9	1	3	13

* Critério 1: redução $\geq 30\%$ de Phe após 8h da administração do medicamento; Critério 2: redução $\geq 30\%$ de Phe após 24h da administração do medicamento

Tabela 3 – Responsividade ao BH₄: associação genótipo-fenótipo de uma amostra de pacientes brasileiros e comparação com dados da literatura

Pacientes	Genótipo		Fenótipo	Resp. ao BH ₄ ^a	Resp. ao BH ₄ conforme genótipo na literatura ^b (Número de pacientes descritos)	Fenótipo da resp. ao BH ₄ conforme literatura ^b (Número de pacientes descritos)
	Alelo 1	Alelo 2				
2	p. I65T	p. R408W	PKU Cla	Sim	Sim (1 paciente)	PKU Atip (2 paciente)
6	p. V388M	IVS71G>A	PKU Cla	Não	nd	nd
12	p. I65T	IVS2+5G>C	PKU Cla	Não	nd	nd
14	p. R261Q	IVS12+1G>A	PKU Cla	Não	nd	nd
17	p. R261Q	IVS12+1G>A	PKU Cla	Não	nd	nd
22	p. I65T	p. R261X	PKU Cla	Não	Não (1 paciente) Sim (1 paciente)	PKU Clã (2 paciente)

PKU Cla, PKU Clássica; PKU Atip, PKU Atípica Resp, Responsividade; nd, not determined

* Os pacientes 14 e 17 são irmãos

^a Os pacientes apresentaram concordância em relação aos critérios de responsividade, ou seja, o paciente responsivo apresentou redução de 30% dos níveis de Phe em 24 horas após a administração de BH₄, e os não-responsivos não apresentaram redução em ambos os pontos.

^b Dados obtidos no BIOPKUdb <http://www.bh4.org/BH4DatabasesBiopku.asp>

Discussão

Este é o primeiro estudo realizado em pacientes brasileiros com HPA-PAH, visando a identificar pacientes responsivos à administração de BH₄ por via oral. Os critérios de inclusão utilizados visaram a selecionar os pacientes mais colaborativos (por isso a adoção do ponto de corte 7 anos para idade) e menos aderentes ao tratamento (por isto o ponto de corte 6 mg/dL para os níveis prévios de Phe), este último também porque o protocolo não previa a aplicação do teste de sobrecarga com Phe. Desta forma, a maioria dos pacientes incluídos pertenceu ao grupo PKU Clássica.

Os níveis plasmáticos de Phe do dia anterior ao do teste de sobrecarga com BH₄ não demonstrou variação nos pontos de hora. Entretanto, quando comparamos os níveis de Phe nos pontos de hora do dia pré e pós BH₄ encontramos uma variação significativa entre eles, reforçando a hipótese de que a variação dos níveis de Phe pós-BH₄ seja um efeito do BH₄.

A taxa de responsividade ao BH₄ dos pacientes variou conforme o critério usado para definição de responsividade, sendo maior quando utilizado o critério 2 (redução $\geq 30\%$ após 24h da administração do medicamento). Quando comparamos os protocolos adaptados de 8h com os de 24h percebe-se, também, que quanto maior o tempo do teste, a possibilidade de detectar responsivos mais lentos aumenta [15, 21]. Além disso, segundo a literatura, o ponto de corte a ser adotado para definição de responsividade ao BH₄ poderia variar conforme o fenótipo clínico do paciente, sendo menor para pacientes com PKU Clássica (redução $>20\%$ nos níveis de Phe) e maior para aqueles pacientes com PKU atípica (redução $\geq 30\%$ nos níveis de Phe) [4].

Quando comparamos o tipo de PKU dos pacientes responsivos ao BH₄ com os dois critérios de responsividade ao medicamento, percebe-se que aqueles que possuíam PKU Clássica aumentaram a porcentagem de responsividade ao longo do tempo (de 1

para 2 pacientes, respectivamente). Entretanto, a taxa de responsividade ao BH₄ daqueles pacientes que possuíam PKU Atípica permaneceu igual (2 pacientes em ambos os protocolos).

Os nossos achados estão de acordo com a literatura. A redução clinicamente significativa nos níveis de Phe em resposta à administração oral de BH₄ é normalmente observada em cerca de 50% em pacientes com PKU atípica [15]. A redução dos níveis de Phe é maior em pacientes com fenótipos mais leves de PKU em comparação a pacientes com fenótipos mais graves, uma vez que a atividade residual da PAH é maior nas formas mais amenas da doença [23, 24]. Nossos resultados demonstraram que pacientes com PKU Clássica também podem ser responsivos ao teste de BH₄. Como relatado na literatura, menos de 10% dos pacientes responsivos ao BH₄ pertence ao grupo de PKU Clássica [15]. Isso se deve ao fato de que esses pacientes possuem a atividade residual da PAH baixa ou até mesmo nula. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que os pacientes considerados não-responsivos de acordo com o protocolo utilizado, ainda possam ser responsivos, se testados mais tarde. Segundo estudos clínicos, verificou-se que protocolos de longo tempo são essenciais para detectar responsivos mais lentos, como por exemplo, protocolos de 48h. [3, 25, 26]. Além disso, Fiege e Blau [4] observaram em seu estudo que um número elevado de pacientes com PKU Clássicos foram responsivos ao teste de sobrecarga com BH₄, particularmente quando o ponto de corte foi reduzido de 30% para 20% (6,8% para 26%).

Ainda não existe consenso em relação a um protocolo padrão-ouro para o diagnóstico da responsividade ao BH₄ [4]. Vários protocolos foram seguidos por diferentes estudos usando tanto a formulação não registrada do BH₄ quanto a sapropterina dihidropterina (forma sintética) [9, 28, 29]. Esses estudos incluíram,

também, a utilização de dieta normal ou dieta restrita em Phe, diferentes doses de BH₄, e diferentes pontos de hora para avaliar os níveis de Phe, por exemplo [21].

Resultados de diferentes estudos são difíceis de comparar, mas a redução de no mínimo 30% dos níveis de Phe é frequentemente considerada resposta clinicamente significativa ao tratamento. No entanto, é importante observar que esse limiar é arbitrário [15]. Para obter uma melhor compreensão sobre as práticas de diagnósticos e tratamento sobre HPA-PAH, um recente estudo foi realizado na Europa.; Blau et al. [35] formularam um questionário constituído de 33 perguntas que foi enviado para 243 profissionais oriundos de 165 centros de PKU de 23 países da Europa. Cento e um questionários foram devolvidos de 93/165 centros de PKU (56%) de 19/23 países europeus (83%). Segundo dados do estudo, o teste de sobrecarga com BH₄ foi realizado como prática rotineiras em 54% dos centros de PKU, dos quais 61% aplicaram o teste com uma dose única de BH₄ (20mg/Kg). Quando questionados sobre como se define a responsividade ao BH₄, 34% responderam que a mesma define-se pela redução $\geq 30\%$ nos níveis de Phe após 24h, seguidas de 17% e 12% na redução $>30\%$ nos níveis de Phe após qualquer ponto de hora e 8h após a ingestão do medicamento, respectivamente. Em relação à classificação do tipo de HPA-PAH, mais de 70% dos entrevistados classificaram PKU Clássica como níveis de Phe $> 20\mu\text{mol/L}$ ao diagnóstico (sem tratamento). Entretanto, as definições para PKU Atípica e HPA leve variou consideravelmente não apenas entre países, mas também entre centros dentro de um mesmo país. Esses achados podem indicar a dificuldade em definir a gravidade da deficiência da PAH, demonstrando a necessidade de padronizar a classificação do tipo de HPA-PAH.

Acreditamos na necessidade de padronizar um teste único, simples e universal que facilite a identificação de responsivos ao BH₄. Esse teste deve ser prático em sua

aplicação, definindo quantidade adequada a ser administrada de BH₄, consumo de Phe e pontos de hora padrões para dosagens de Phe, restringindo desta forma o número de mensurações dos níveis de Phe que precisam ser feitas e definindo um padrão-ouro para interpretação da responsividade ao medicamento.

Em um futuro muito próximo, como já está acontecendo em alguns países, o tratamento com o BH₄ pode vir a aliviar uma parte considerável de pacientes com HPA-PAH que sofrem com as restrições dietéticas. Isso, certamente, significará uma melhora significativa da qualidade de vida desses pacientes, assim como uma contribuição importante para a assistência dos mesmos, podendo gerar uma melhor adesão ao tratamento [12].

Agradecimentos

Os autores agradecem à *Merck Serono* pela doação do medicamento Kuvan[®], utilizada no estudo. Agradecemos também ao Juarez Huve, Cristina Netto, Carolina Fischinger M. de Souza, Lilia Farret Refosco, a Casa de Apoio do HCPA e à toda equipe do Serviço de Genética Médica do HCPA pelo apoio e colaboração sobre esse estudo. Este trabalho foi apoiado pelo FIPE / HCPA (projeto n° 07-553) e pelo Conselho Nacional de Pesquisa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- [1] J.C. Coelho, M. Wajner, M.G. Burin, C.R. Vargas, R. Giugliani, Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism *Eur J Pediatr* 156 (1997) 650-654.
- [2] S. Kure, D.C. Hou, T. Ohura, H. Iwamoto, S. Suzuki, N. Sugiyama, O. Sakamoto, K. Fujii, Y. Matsubara, K. Narisawa, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *J Pediatr* 135 (1999) 375-378.
- [3] B. Fiege, L. Bonafe, D. Ballhausen, M. Baumgartner, B. Thony, D. Meili, L. Fiori, M. Giovannini, N. Blau, Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S91-95.
- [4] B. Fiege, N. Blau, Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria *J Pediatr* 150 (2007) 627-630.
- [5] H.L. Levy, A. Milanowski, A. Chakrapani, M. Cleary, P. Lee, F.K. Trefz, C.B. Whitley, F. Feillet, A.S. Feigenbaum, J.D. Bechuk, H. Christ-Schmidt, A. Dorenbaum, Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study *Lancet* 370 (2007) 504-510.
- [6] R. Matalon, R. Koch, K. Michals-Matalon, K. Moseley, S. Surendran, S. Tyring, H. Erlandsen, A. Gamez, R.C. Stevens, A. Romstad, L.B. Moller, F. Guttler, Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *Genet Med* 6 (2004) 27-32.
- [7] R. Matalon, K. Michals-Matalon, R. Koch, J. Grady, S. Tyring, R.C. Stevens, Response of patients with phenylketonuria in the US to tetrahydrobiopterin *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S17-21.
- [8] K. Michals-Matalon, G. Bhatia, F. Guttler, S.K. Tyring, R. Matalon, Response of phenylketonuria to tetrahydrobiopterin *J Nutr* 137 (2007) 1564S-1567S; discussion 1573S-1575S.
- [9] B.K. Burton, D.K. Grange, A. Milanowski, G. Vockley, F. Feillet, E.A. Crombez, V. Abadie, C.O. Harding, S. Cederbaum, D. Dobbelaere, A. Smith, A. Dorenbaum, The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open-label, screening study *J Inher Metab Dis* 30 (2007) 700-707.
- [10] P. Lee, E.P. Treacy, E. Crombez, M. Wasserstein, L. Waber, J. Wolff, U. Wendel, A. Dorenbaum, J. Bechuk, H. Christ-Schmidt, M. Seashore, M. Giovannini, B.K. Burton, A.A. Morris, Safety and efficacy of 22 weeks of treatment with sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria *Am J Med Genet A* 146A (2008) 2851-2859.
- [11] K. Michals-Matalon, Sapropterin dihydrochloride, 6-R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, in the treatment of phenylketonuria *Expert Opin Investig Drugs* 17 (2008) 245-251.
- [12] A. Muntau, S. Gersting, Treatment of patients with tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, in: N. Blau (Ed.), *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*, SPS Verlagsgesellschaft, Heilbronn, 2006, pp. 401-433.
- [13] F.K. Trefz, B.K. Burton, N. Longo, M.M. Casanova, D.J. Gruskin, A. Dorenbaum, E.D. Kakkis, E.A. Crombez, D.K. Grange, P. Harmatz, M.H. Lipson, A. Milanowski, L.M. Randolph, J. Vockley, C.B. Whitley, J.A. Wolff, J. Bechuk, H.

- Christ-Schmidt, J.B. Hennermann, Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study *J Pediatr* 154 (2009) 700-707.
- [14] F.K. Trefz, D. Scheible, G. Frauendienst-Egger, H. Korall, N. Blau, Long-term treatment of patients with mild and classical phenylketonuria by tetrahydrobiopterin *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S75-80.
- [15] N. Blau, A. Belanger-Quintana, M. Demirkol, F. Feillet, M. Giovannini, A. MacDonald, F.K. Trefz, F.J. van Spronsen, Optimizing the use of sapropterin (BH(4)) in the management of phenylketonuria *Mol Genet Metab* 96 (2009) 158-163.
- [16] M.R. Zurfluh, J. Zschocke, M. Lindner, F. Feillet, C. Chery, A. Burlina, R.C. Stevens, B. Thony, N. Blau, Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *Hum Mutat* 29 (2008) 167-175.
- [17] H. Erlandsen, Molecular mechanism of tetrahydrobiopterin-responsiveness, in: N. Blau (Ed.), *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*, SPS Verlagsgesellschaft, Heilbronn, 2006, pp. 376-400.
- [18] N. Blau, H. Erlandsen, The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency *Mol Genet Metab* 82 (2004) 101-111.
- [19] B. Thöny, Tetrahydrobiopterin and its functions, in: N. Blau (Ed.), *PKU and BH4: Advances in Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin*, SPS Verlagsgesellschaft, Heilbronn, 2006, pp. 503-554.
- [20] P. Guldberg, F. Rey, J. Zschocke, V. Romano, B. Francois, L. Michiels, K. Ullrich, G.F. Hoffmann, P. Burgard, H. Schmidt, C. Meli, E. Riva, I. Dianzani, A. Ponzzone, J. Rey, F. Guttler, A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype *Am J Hum Genet* 63 (1998) 71-79.
- [21] N. Blau, Defining tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness in PKU *J Inherit Metab Dis* 31 (2008) 2-3.
- [22] A. Baldellou Vazquez, M.I. Salazar Garcia-Blanco, M.P. Ruiz-Echarri Zalaya, C. Campos Calleja, L. Ruiz Desviat, M. Ugarte Perez, [Tetrahydrobiopterin therapy for hyperphenylalaninemia due to phenylalanine hydroxylase deficiency. When and how?] *An Pediatr (Barc)* 64 (2006) 146-152.
- [23] B. Perez-Duenas, M.A. Vilaseca, A. Mas, N. Lambruschini, R. Artuch, L. Gomez, J. Pineda, A. Gutierrez, M. Mila, J. Campistol, Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria *Clin Biochem* 37 (2004) 1083-1090.
- [24] M.D. Boveda, M.L. Couce, D.E. Castineiras, J.A. Cocho, B. Perez, M. Ugarte, J.M. Fraga, The tetrahydrobiopterin loading test in 36 patients with hyperphenylalaninaemia: evaluation of response and subsequent treatment *J Inherit Metab Dis* 30 (2007) 812.
- [25] A. Belanger-Quintana, M.J. Garcia, M. Castro, L.R. Desviat, B. Perez, B. Mejia, M. Ugarte, M. Martinez-Pardo, Spanish BH4-responsive phenylalanine hydroxylase-deficient patients: evolution of seven patients on long-term treatment with tetrahydrobiopterin *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S61-66.
- [26] J.B. Hennermann, C. Buhner, N. Blau, B. Vetter, E. Monch, Long-term treatment with tetrahydrobiopterin increases phenylalanine tolerance in children with severe phenotype of phenylketonuria *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S86-90.
- [27] A.C. Muntau, W. Roschinger, M. Habich, H. Demmelmair, B. Hoffmann, C.P. Sommerhoff, A.A. Roscher, Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria *N Engl J Med* 347 (2002) 2122-2132.

- [28] H. Levy, B. Burton, S. Cederbaum, C. Scriver, Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH(4)) in phenylketonuria and its use in treatment *Mol Genet Metab* 92 (2007) 287-291.
- [29] U. Langenbeck, Classifying tetrahydrobiopterin responsiveness in the hyperphenylalaninaemias *J Inherit Metab Dis* 31 (2008) 67-72.
- [30] H. Shintaku, S. Kure, T. Ohura, Y. Okano, M. Ohwada, N. Sugiyama, N. Sakura, I. Yoshida, M. Yoshino, Y. Matsubara, K. Suzuki, K. Aoki, T. Kitagawa, Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene *Pediatr Res* 55 (2004) 425-430.
- [31] J.J. Mitchell, B. Wilcken, I. Alexander, C. Ellaway, H. O'Grady, V. Wiley, J. Earl, J. Christodoulou, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylketonuria: the New South Wales experience *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1 (2005) S81-85.
- [32] C. Bernegger, N. Blau, High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1,919 patients observed from 1988 to 2002 *Mol Genet Metab* 77 (2002) 304-313.
- [33] U. Lassker, J. Zschocke, N. Blau, R. Santer, Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria. Two new cases and a review of molecular genetic findings *J Inherit Metab Dis* 25 (2002) 65-70.
- [34] L.R. Desviat, B. Perez, A. Belanger-Quintana, M. Castro, C. Aguado, A. Sanchez, M.J. Garcia, M. Martinez-Pardo, M. Ugarte, Tetrahydrobiopterin responsiveness: results of the BH4 loading test in 31 Spanish PKU patients and correlation with their genotype *Mol Genet Metab* 83 (2004) 157-162.
- [35] N. Blau, A. Belanger-Quintana, M. Demirkol, F. Feillet, M. Giovannini, A. Macdonald, F.K. Trefz, F.V. Spronsen, Management of phenylketonuria in Europe: Survey results from 19 countries *Mol Genet Metab* (2009).

9. CONCLUSÕES

Objetivo Específico 1 - Associar a resposta bioquímica à administração de BH₄ com o tipo de hiperfenilalaninemia por deficiência primária da fenilalanina hidroxilase apresentada pelo paciente.

- 1) A responsividade ao BH₄ foi maior naqueles pacientes que possuíam formas mais leves de PKU, independente do critério utilizado. Esse achado está de acordo com o que é descrito na literatura.
- 2) Nossos resultados demonstraram que pacientes com PKU Clássica também podem ser responsivos ao teste de BH₄. Acreditamos na importância de sempre incluir esse grupo de pacientes nos teste de sobrecarga com BH₄.

Objetivo específico 2 - Associar a resposta bioquímica à administração de BH₄ com as mutações presentes no gene fenilalanina hidroxilase.

Os dados de genótipo e de variabilidade intrafamiliar, embora limitados pelo pequeno tamanho amostral, confirmam o caráter multifatorial da responsividade ao BH₄.

10. COMENTÁRIOS FINAIS E PERSPECTIVAS

Em um futuro muito próximo, como já está acontecendo em alguns países, o tratamento com o BH₄ pode vir a aliviar uma parte considerável de pacientes com HPA-PAH que sofrem com as restrições dietéticas. Isso, certamente, significará uma melhora significativa da qualidade de vida desses pacientes, assim como uma contribuição importante para a assistência aos mesmos, podendo gerar uma melhor adesão ao tratamento.

Acreditamos na necessidade de padronizar um teste único, simples e universal que facilite a identificação de pacientes responsivos ao BH₄. Esse teste deve ser prático em sua aplicação, definindo quantidade adequada do BH₄ a ser administrada, o consumo de Phe recomendado e os pontos de hora padrões para as dosagens de Phe, restringindo desta forma o número de mensurações dos níveis de Phe que precisam ser feitas definindo assim um padrão-ouro para a interpretação da responsividade ao medicamento.

A partir desse trabalho, a equipe do Ambulatório de Tratamento de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do HCPA está desenvolvendo um novo projeto com a aplicação de um protocolo do teste de sobrecarga Phe/BH₄ nos pacientes com HPA-PAH em tratamento dietético, com o intuito de ampliar a detecção de pacientes que poderiam se habilitar a receber o tratamento com BH₄ oral.

11. APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: HIPERFENILALANINEMIA POR DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE: IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS RESPONSIVOS À ADMINISTRAÇÃO DE TETRAHIDROBIOPTERINA POR VIA ORAL

Pesquisador responsável: Dra. Ida Vanessa D. Schwartz. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre-RS. Tel: 51-21018011.

Paciente: _____

Prezado paciente ou responsável,

Como você sabe, a palavra “hiperfenilalaninemia” significa aumento dos níveis do aminoácido fenilalanina no sangue. A hiperfenilalaninemia é um quadro tratável no qual, em razão da deficiência e/ou ausência de uma enzima (a fenilalanina hidroxilase), o organismo não consegue eliminar de maneira adequada a fenilalanina, resultando em uma doença chamada fenilcetonúria. Sabe-se que níveis elevados de fenilalanina são tóxicos ao cérebro, podendo ocasionar retardo mental e problemas de comportamento. Para a fenilalanina hidroxilase funcionar adequadamente, ela conta com a ajuda de uma outra substância chamada tetrahydrobiopterina ou BH4 (algumas pessoas podem apresentar hiperfenilalaninemia por deficiência de BH4; isto é bastante raro, mas, neste caso, os pacientes são tratados com reposição do BH4 e outros medicamentos, mas não com dieta). Muitas pesquisas realizadas no mundo têm sugerido que pacientes com deficiência de fenilalanina hidroxilase podem ter os seus níveis de fenilalanina melhor controlados mediante a administração de BH4.

Esta pesquisa tem por objetivo a identificação de indivíduos responsivos à administração de dose única de BH4 por via oral. Esse estudo será realizado em pacientes com hiperfenilalaninemia por deficiência da fenilalanina hidroxilase em tratamento no Ambulatório de Distúrbios Metabólicos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SGM-HCPA), que apresentam níveis de fenilalanina superiores a 6 mg/dL nos últimos doze meses, que tenham no mínimo 7 anos de idade, que não apresentem problemas no fígado, que não tenham alergia a

algum dos componentes do BH4, que não estejam também tomando alguns medicamentos específicos, e que, no caso do sexo feminino, não sejam gestantes.

Caso você decida participar dessa pesquisa, será necessário que você (paciente) fique um dia inteiro no HCPA fazendo avaliações. No início deste dia, você será submetido à coleta de 4ml de sangue para dosagem de fenilalanina (em jejum; este é o momento 0). Logo após a coleta, você deverá ingerir uma dose única de 20 mg/kg de BH4 (cada comprimido de BH4 tem 50 mg; este é o único momento do estudo no qual será administrado o medicamento). Novas coletas de 4ml de sangue serão realizadas 4 horas (momento 1), 8 horas (momento 2) e 24 horas (momento 3) após a ingestão do BH4, para dosagem de fenilalanina. Durante todo o período do estudo, você deverá alimentar-se da maneira usual, ou seja, como você faz normalmente durante todos os outros dias, inclusive usando a sua fórmula metabólica.

Além disso, você (paciente) será convidado a vir ao HCPA no dia anterior ao da sobrecarga com o BH4, para que sejam feitas, também, exames de dosagens de fenilalanina, **sem o uso do BH4**, com o objetivo de observar a sua variação diária normal de fenilalanina. Assim, se você tiver disponibilidade de horário, será feita, também, a coleta de sangue em pontos de hora: 8/12/16h ou 9/13/17h (conforme hora que você chegar no HCPA). É bom salientar que em cada ponto de hora será coletado 4ml de sangue em heparina.

Também serão revisados dados do seu histórico médico, presentes no seu prontuário, e que auxiliarão os pesquisadores deste estudo a entender os resultados obtidos. Os resultados das suas medidas de fenilalanina serão comunicados a você assim que estiverem disponíveis (imagina-se que no máximo até 3 meses após a realização do teste). Caso, no momento 0, a medida de fenilalanina seja inferior a 6 mg/dL você será convidado a repetir o teste, se for do seu interesse.

RISCOS E DESCONFORTOS

Os riscos e desconfortos causados pela coleta de sangue são semelhantes aos riscos envolvidos na coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina (manchas roxas e dor no local da coleta). O desconforto e os riscos associados a estas avaliações serão minimizados pela realização da coleta por profissional treinado.

As pessoas que usam BH4 não costumam apresentar efeitos adversos, mas, assim como acontece com qualquer medicamento, reações inesperadas podem

acontecer. Se algum efeito acontecer, a equipe de pesquisadores deste estudo deve ser imediatamente comunicada, a fim de que as medidas cabíveis sejam tomadas.

CUSTOS

Não haverá compensação financeira pela sua participação no estudo. Entretanto, todos os custos envolvidos durante a sua execução (coletas, transporte, acomodação e alimentação), para você e um acompanhante, serão cobertos pelo projeto.

Também deve ficar claro que, mesmo que você apresente uma boa resposta à administração de BH4, este estudo não prevê que você continue recebendo este medicamento, uma vez que ele não foi aprovado para uso no Brasil e que você já recebe o tratamento padrão para Fenilcetonúria (a fórmula metabólica).

AUTORIZAÇÕES

Você (paciente ou responsável) autorizou:

1) A coleta de 4mL de sangue nos pontos de hora: 8/12/16h ou 9/13/17h, no dia anterior à tomada de BH4, para dosagem de fenilalanina e observação da variação da fenilalanina diária, sem o uso do BH4.

() Sim

() Não

2) A coleta de 4mL de sangue nos pontos 0 (imediatamente antes de tomar o BH4), 1 (4 horas após tomar o BH4), 2 (8 horas após tomar o BH4) e 3 (24 horas após tomar o BH4), para dosagem de fenilalanina.

() Sim

() Não

3) Se você permitir, o material coletado que restar após a realização dos exames previstos neste estudo, serão armazenados por cinco anos e poderão ser utilizados, neste período, em estudos aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis. Em relação ao armazenamento e utilização de algum material (sangue) que tenha restado após a realização dos exames previstos neste estudo, você declara que autorizou:

() que este material poderá ser armazenado por cinco anos e poderá vir a ser utilizado em estudos futuros aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões

responsáveis, desde que você revise e assine o termo de consentimento de tais estudos futuros. Após cinco anos, este material será obrigatoriamente descartado.

() que este material não poderá ser armazenado por cinco anos e não poderá vir a ser utilizado em estudos futuros aprovados eticamente pelos órgãos ou comissões responsáveis. O material coletado deverá ser utilizado somente neste estudo, e o material que sobrar não deverá ser armazenado, sendo obrigatoriamente descartado.

Cabe salientar que esse estudo talvez não traga benefícios para você, mas que pode ajudar a melhorar, futuramente, o tratamento dos pacientes com deficiência de fenilalanina hidroxilase.

DÚVIDAS

Se você tiver alguma dúvida em relação à pesquisa, deve contatar a Dra. Ida Vanessa D. Schwartz (Fone: 51- 99017418 ou 2101-8011), no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO NA PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO

Sua participação no estudo é voluntária. Se você decidir não participar do estudo, isto não afetará em nada o seu tratamento no seu hospital. A sua participação pode também ser interrompida a qualquer momento por você mesmo (a). Em qualquer caso, você não será penalizado (a).

CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES

As informações dessa pesquisa serão mantidas em sigilo, sendo apenas utilizadas de forma científica e anônima, em relatos especializados, com autorização prévia. Caso alguma informação derivada desse estudo for importante a você, todo esforço será realizado para informá-lo.

Pelo presente termo, você declara que foi informado (a), de forma clara e detalhada, sobre a presente pesquisa, e que teve suas dúvidas esclarecidas por _____ . Declara ter sido esclarecido que não receberá nenhuma remuneração financeira pela participação no estudo. Declara que foi informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, bem como da liberdade de não participar do estudo e da possibilidade de desistir, em qualquer momento, da participação. Além disso, declara que assinou duas vias deste consentimento, e que uma ficou em seu poder.

Data: ___/___/_____

Paciente: _____

Responsável legal: _____

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, e entreguei cópia deste termo de consentimento para o mesmo.

Data: ____/____/____

Nome: _____

Obs.: O presente documento, baseado no item IV das diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisa em saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinada em duas vias, de igual valor, ficando uma via em poder do voluntário ou de seu responsável legal e outra com o pesquisador responsável

APÊNDICE B - Ficha de Registro do Paciente

Nome do paciente:

Data de Nascimento:

Sexo: () Feminino () Masculino

Estado Civil:

Naturalidade:

Nome do Pai:

Nome da Mãe:

Endereço Completo

Rua/Av: _____ No: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Estado: _____ CEP: _____ Telefone: _____

Celular: _____ Fax _____ e-mail: _____

Idade do Diagnóstico:

Nível de Phe ao diagnóstico:

Tipo de HPA:

Genótipo:

Nível médio de Phe no último ano:

Número de dosagens realizadas no último ano e resultados:

Data	Phe (mg/dL)	Observação

Data/valor do último nível de Phe:

Dieta atualmente prescrita:

Usa algum tipo de medicamento: () Não
() Sim. Quais?

É gestante: () Não
() Sim

Tem envolvimento hepática clinicamente: () Não
() Sim

Te alergia a algum dos componentes do BH₄: () Sim () Não

Faz fazendo uso de levodopa ou de medicamentos que afetam a metabolismo do folato ou a vasodilatação mediada por óxido nítrico: () Sim () Não

Data de realização do teste:

Peso:

Resultados:

Coletas pré administração de BH₄

Ponto de coleta pré- BH ₄	Valor Phe	Observações
0 (8h ou 9h)*		
1 (12h ou 13h)*		
2 (16h ou 17h)*		

*Conforme hora de chegada do paciente no HCPA

Coletas com administração de BH₄

Ponto de coleta com BH ₄	Valor Phe	Observações
0		
1 (4h)		
2 (8 h)		
3 (24 h)		

APÊNDICE C – Modelo de Inquérito alimentar de 3 dias utilizado no estudo**INQUÉRITO ALIMENTAR**

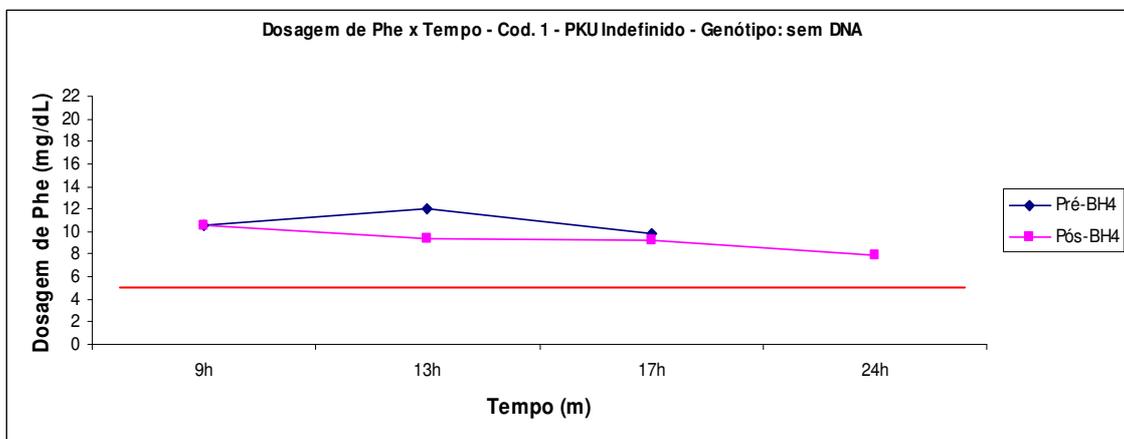
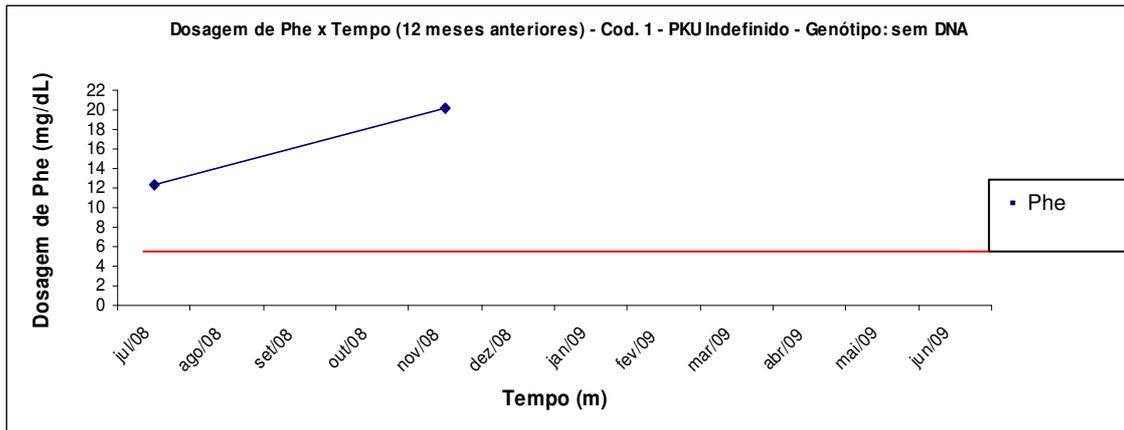
Nome Paciente: _____

DATA ___/___/___

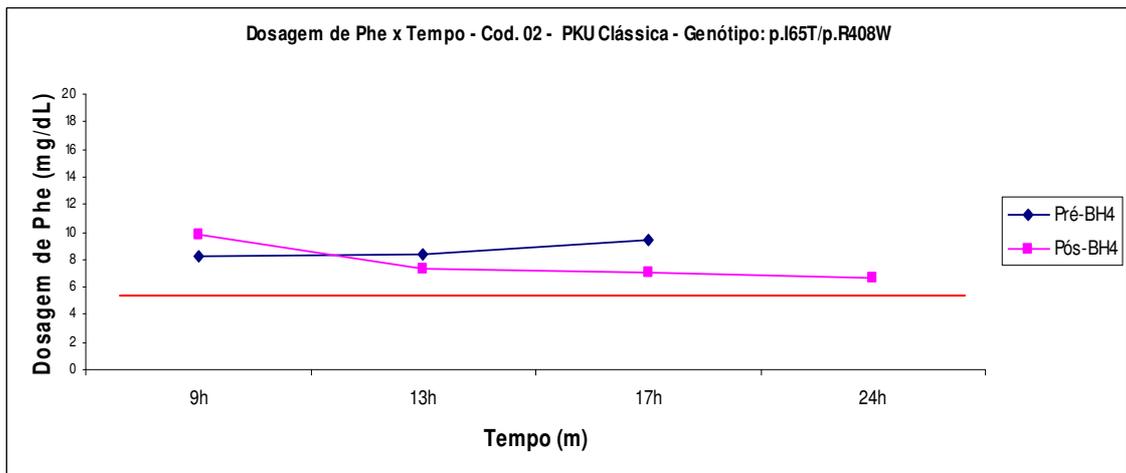
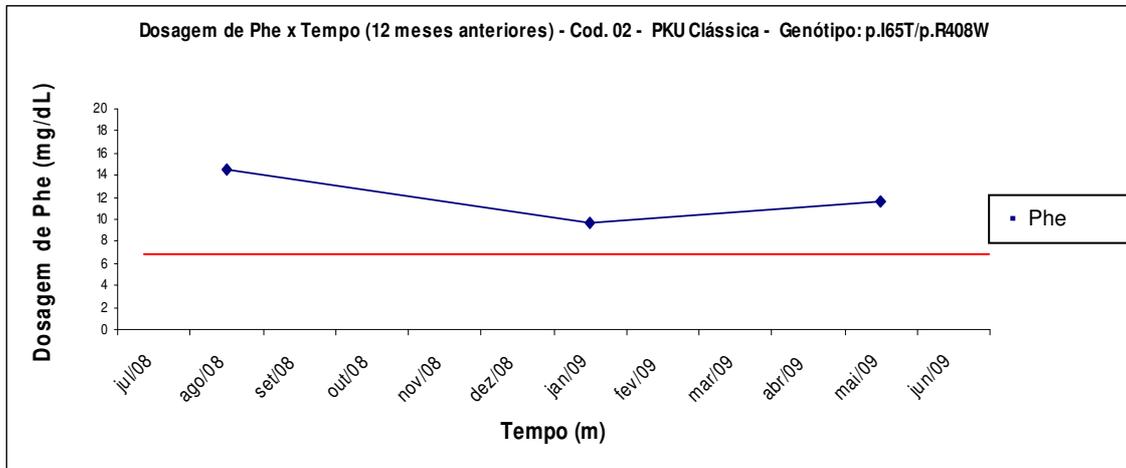
REFEIÇÃO	ALIMENTOS INGERIDOS	QUANTIDADE (medida caseira)
Café da Manhã Horário: _____ Local: _____		
Lanche da Manhã Horário: _____ Local: _____		
Almoço Horário: _____ Local: _____		
Lanche da Tarde Horário: _____ Local: _____		
Jantar Horário: _____ Local: _____		
Ceia Horário: _____ Local: _____		
Intervalo refeições		

APÊNDICE D – Gráficos dos pacientes em relação aos níveis de Fenilalanina plasmáticos (mg/dL) nos 12 meses anteriores à sua data de inclusão no estudo e da variação de Fenilalanina plasmática (mg/dL) entre o dia pré e pós BH4.

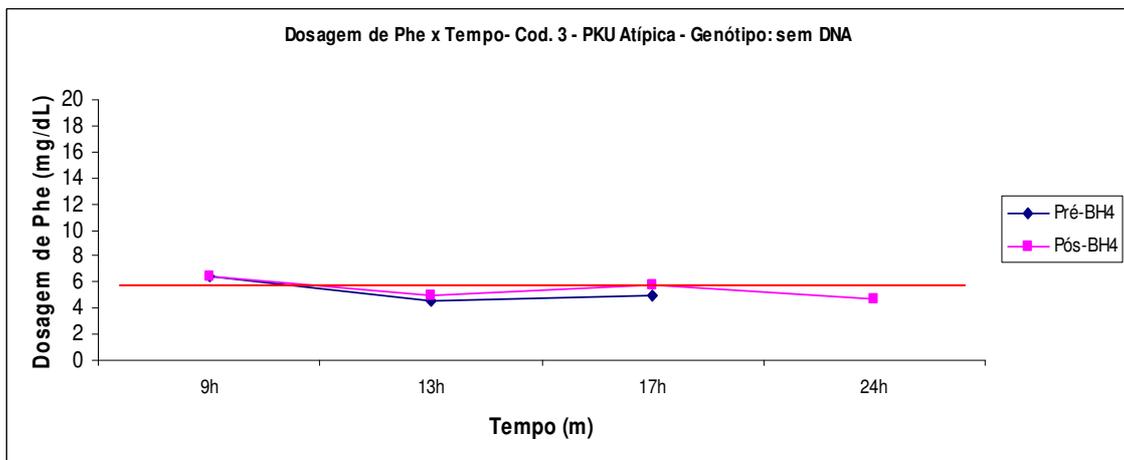
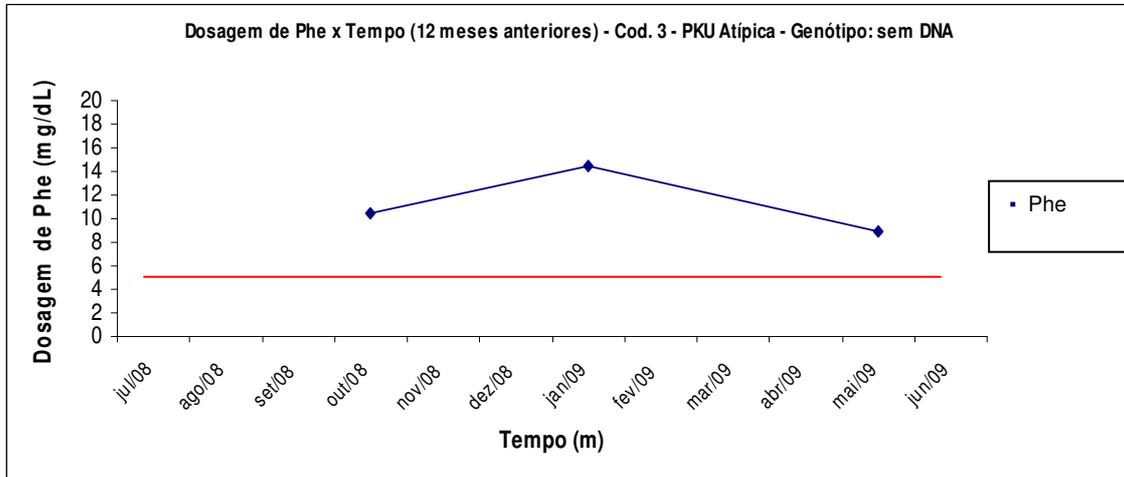
1. Paciente 1



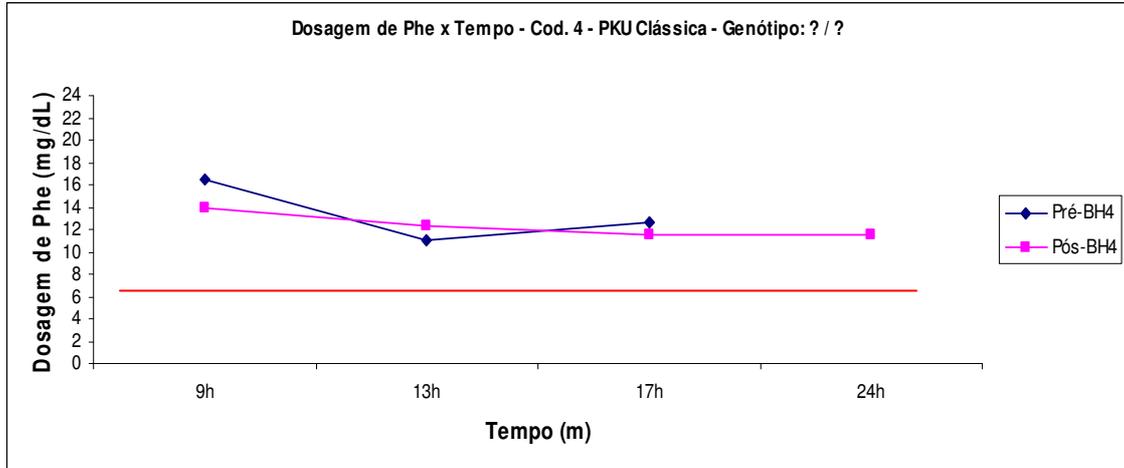
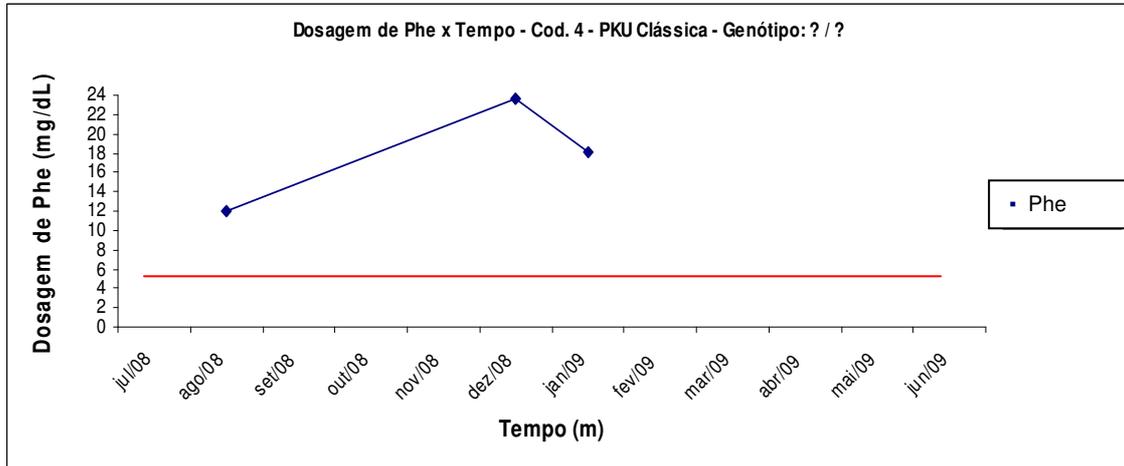
2. Paciente 2



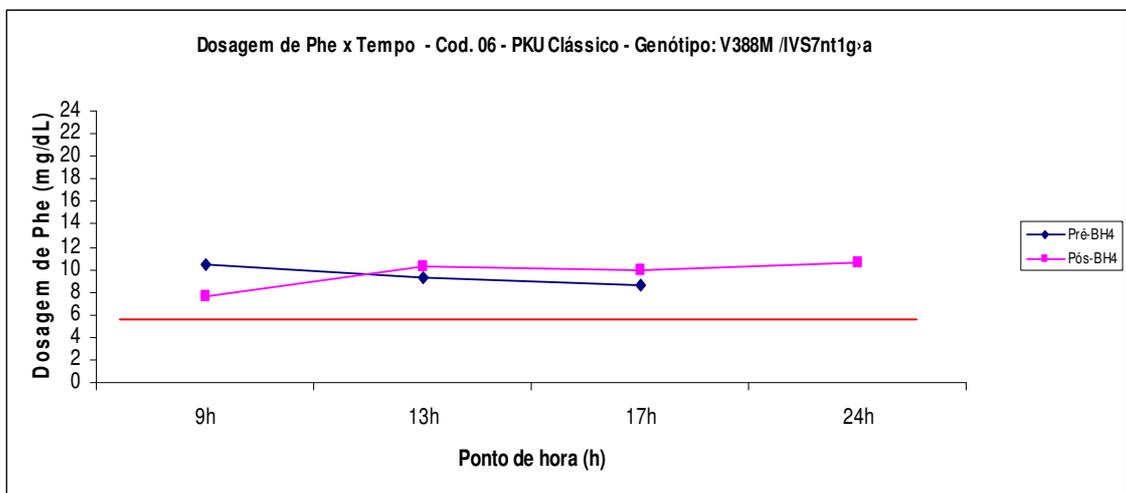
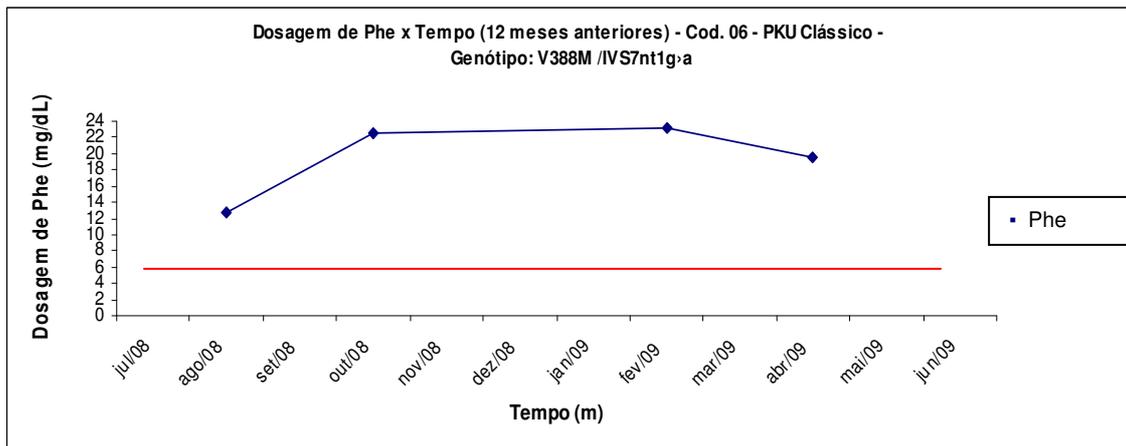
3. Paciente 3



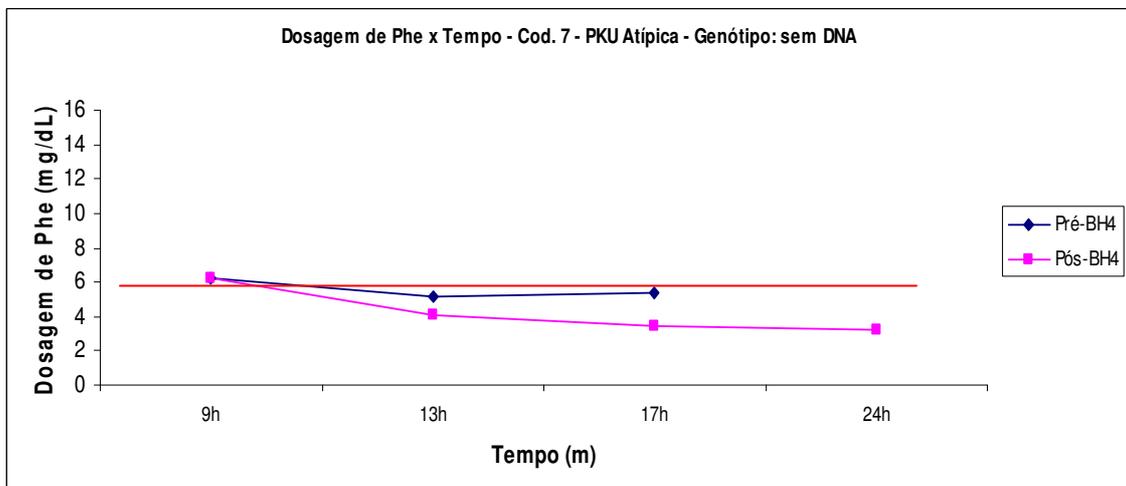
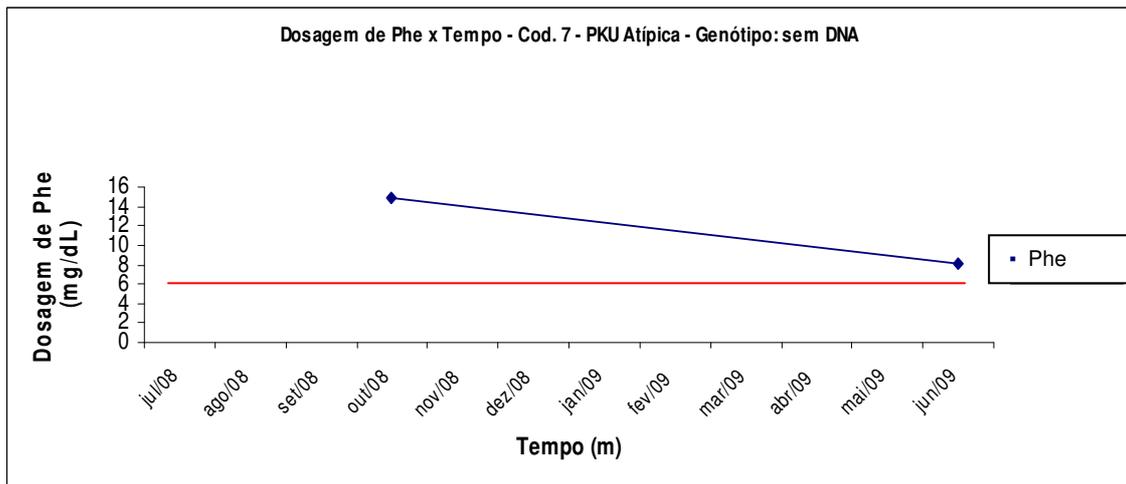
4. Paciente 4



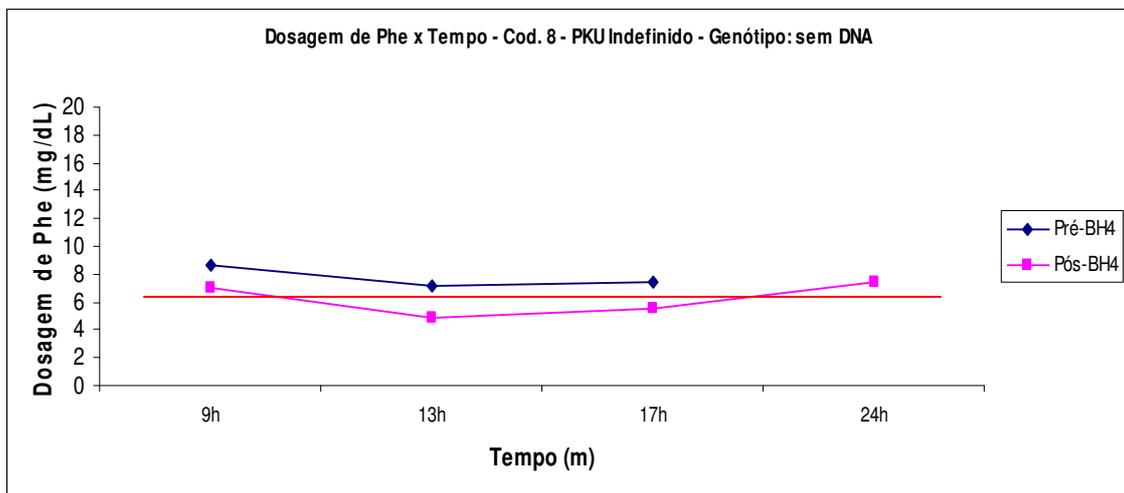
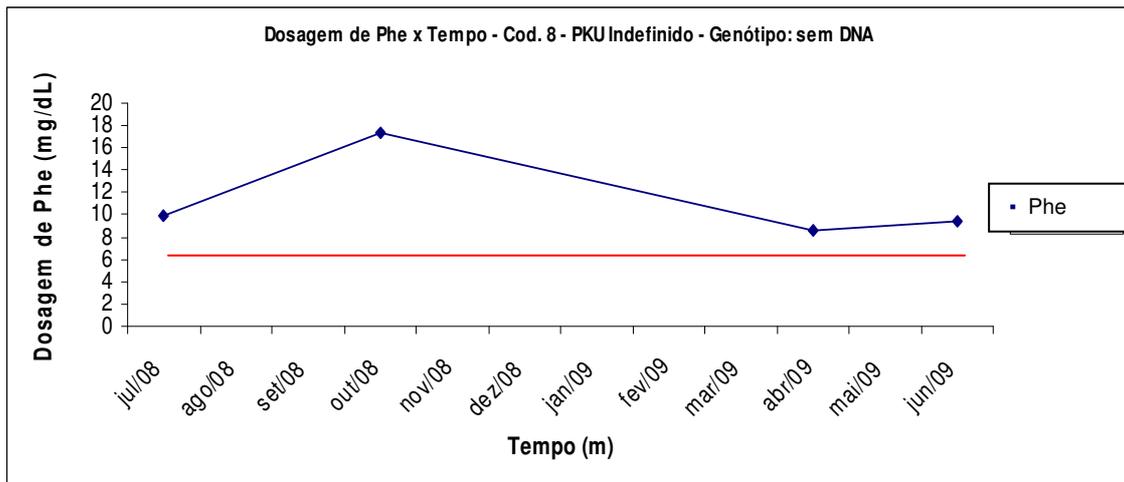
5. Paciente 6



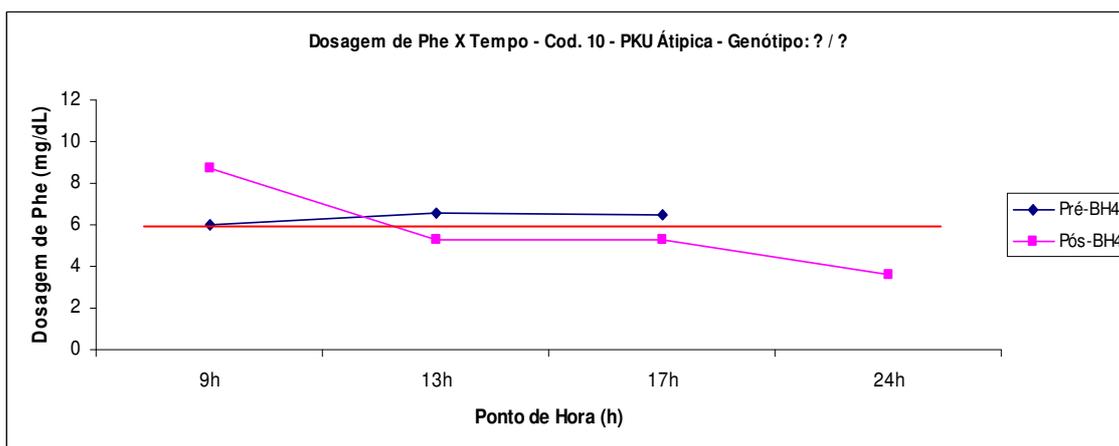
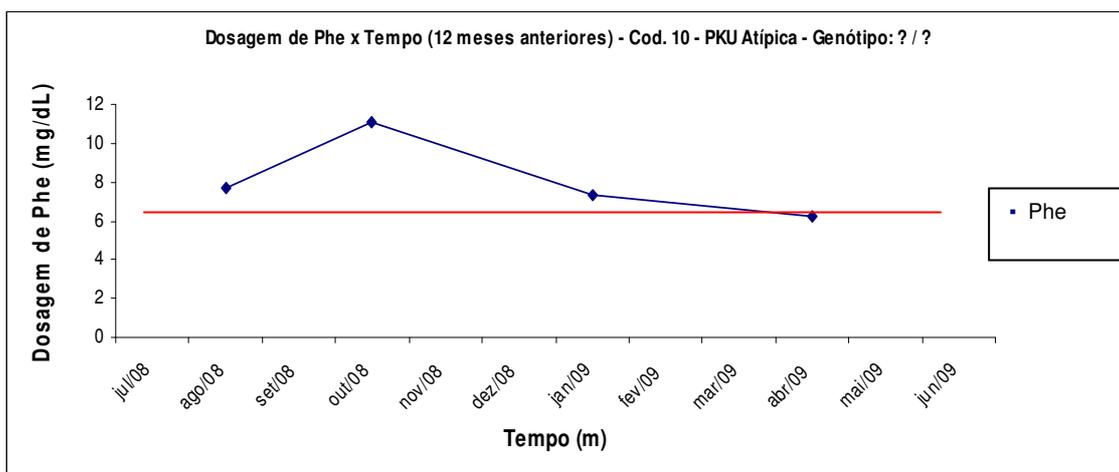
6. Paciente 7



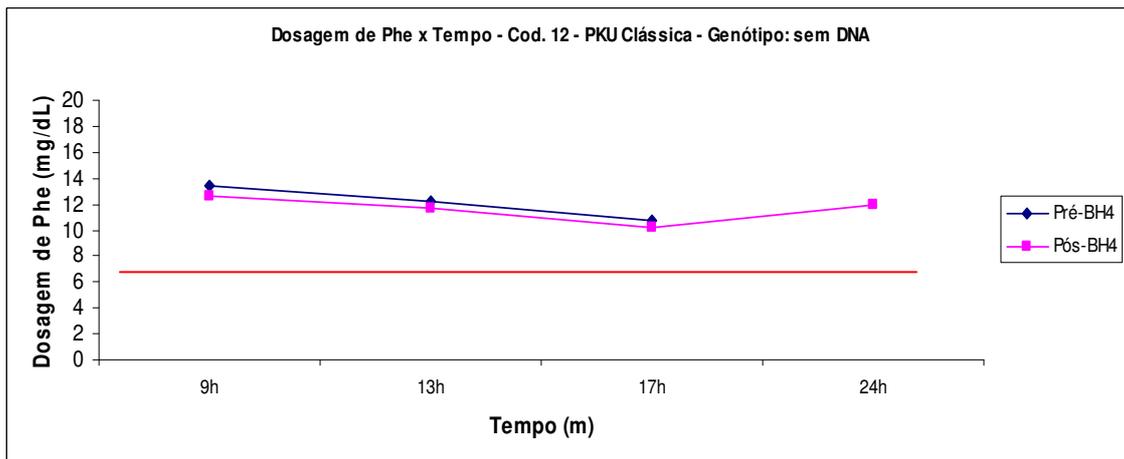
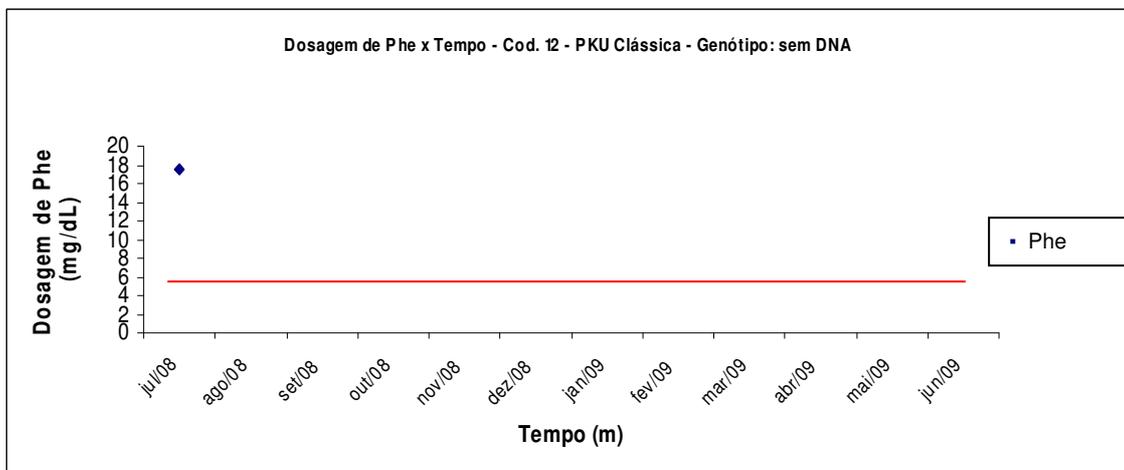
7. Paciente 8



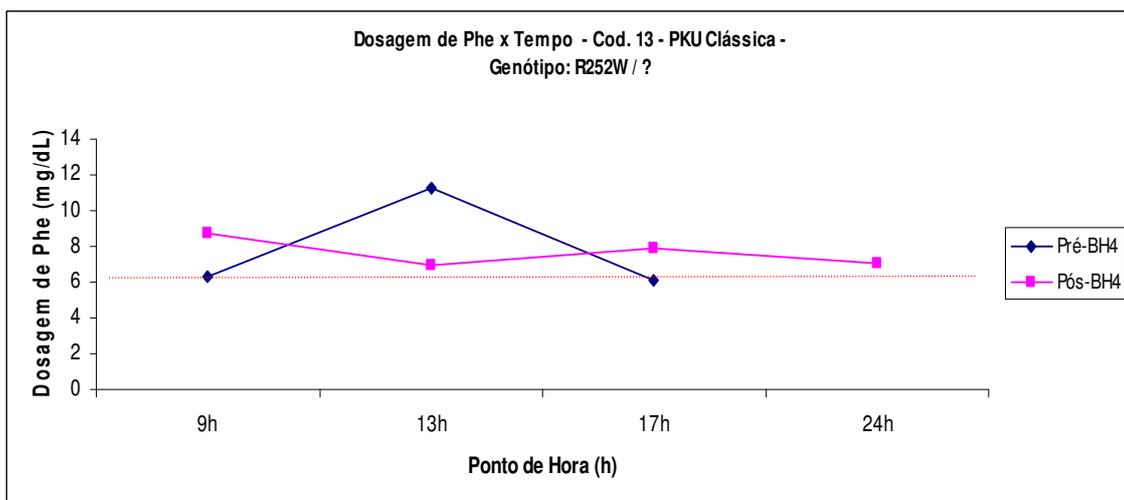
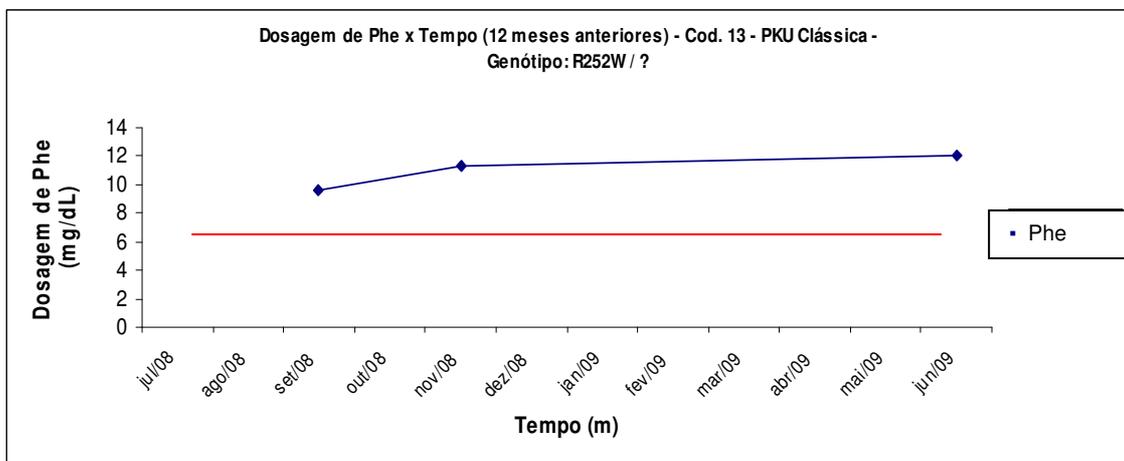
8. Paciente 10



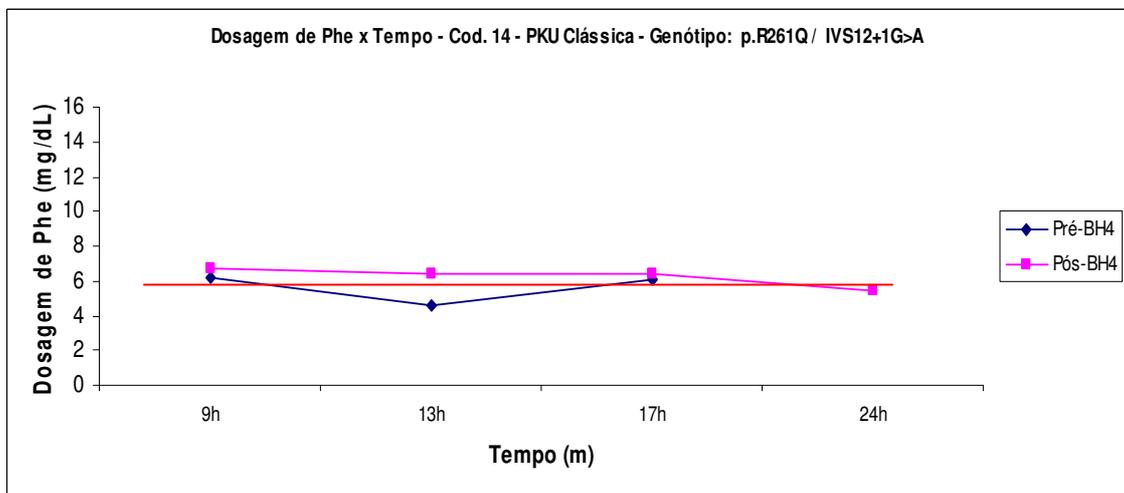
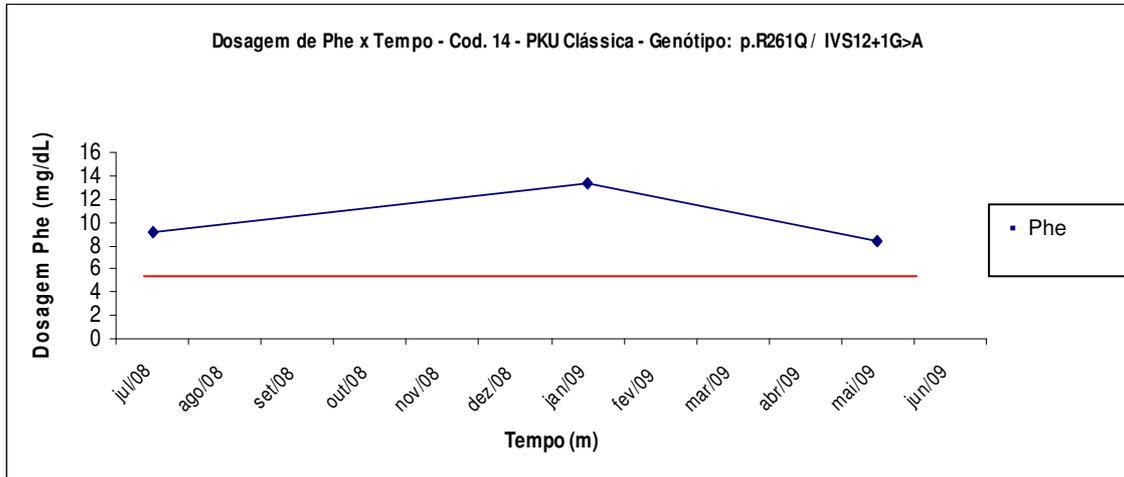
9. Paciente 12



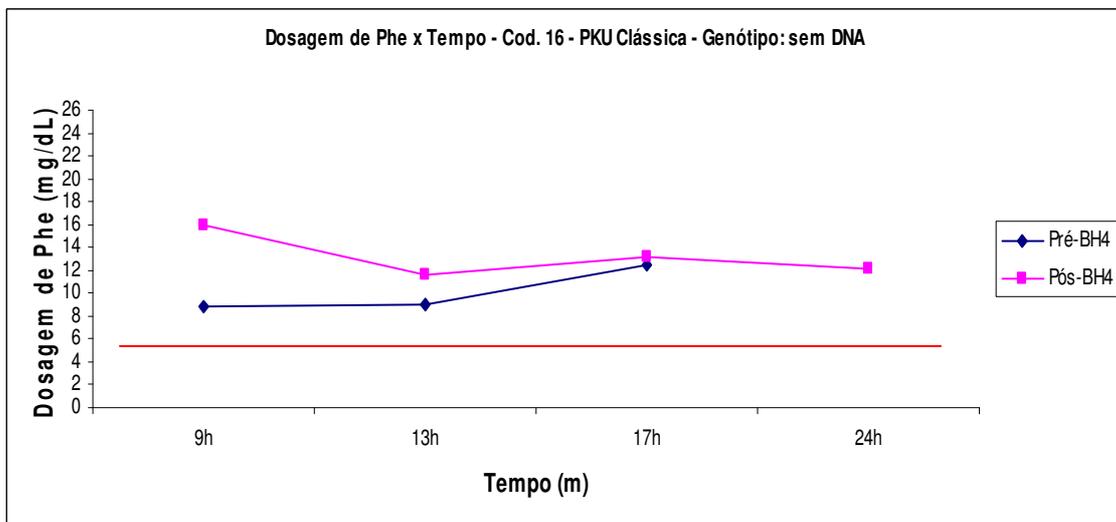
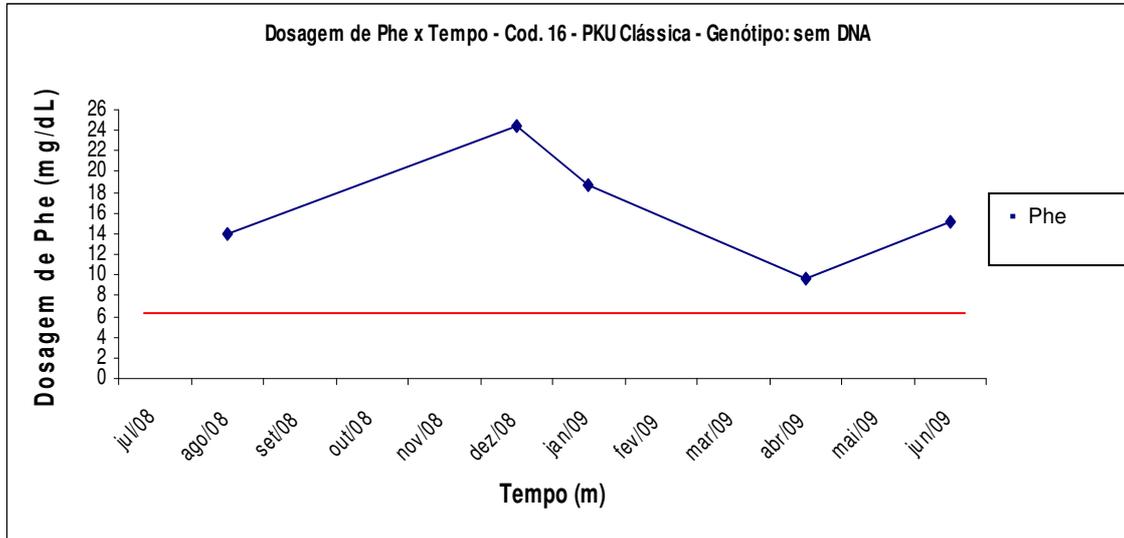
10. Paciente 13



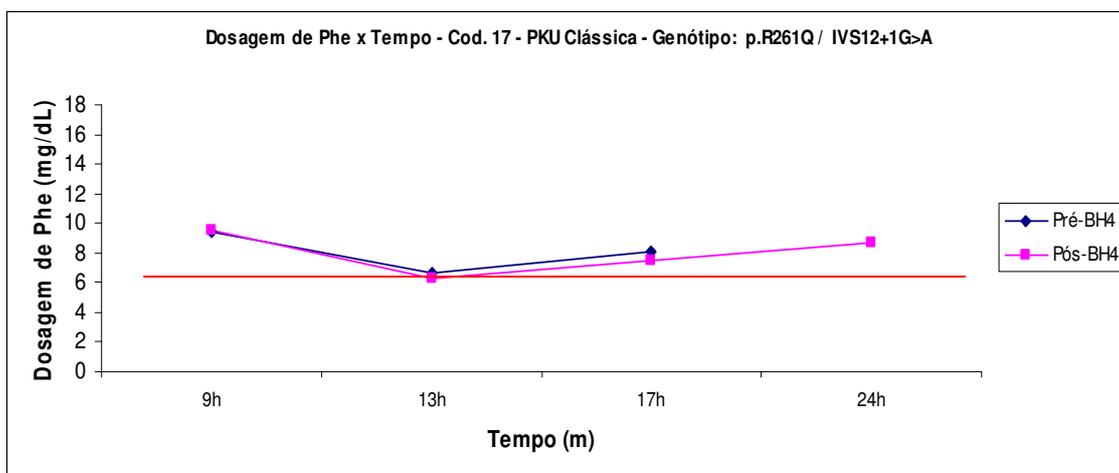
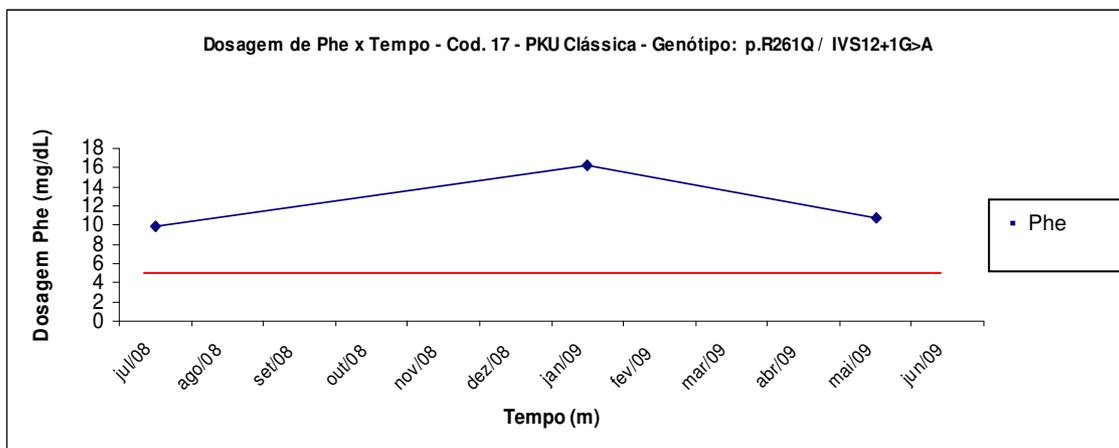
11. Paciente 14



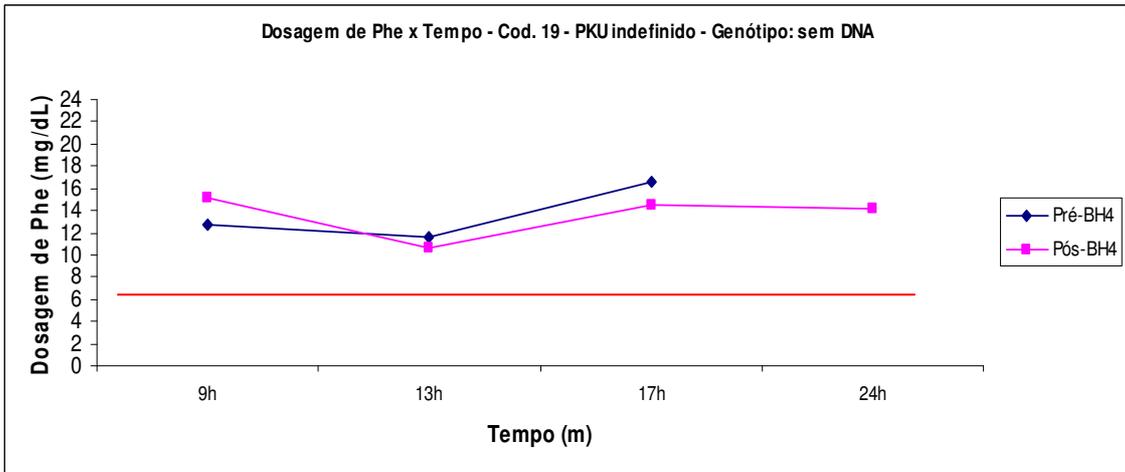
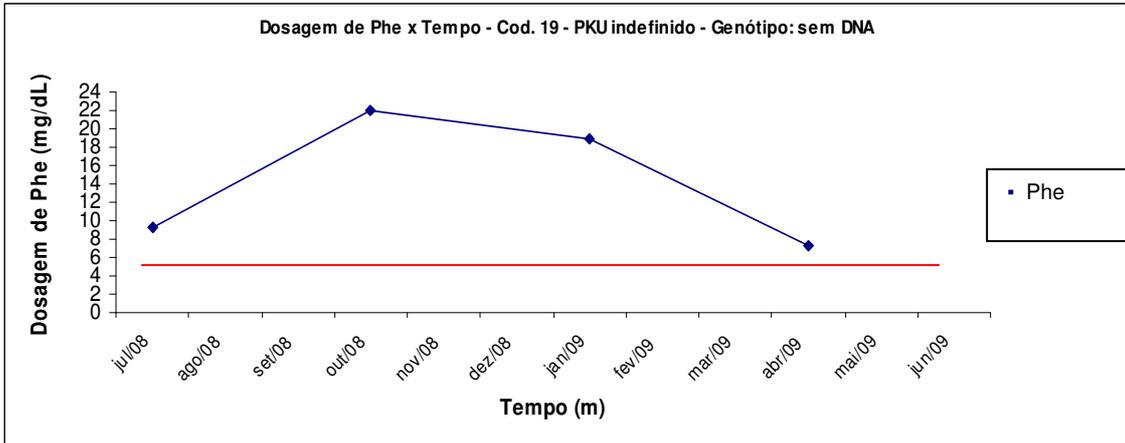
12. Paciente 16



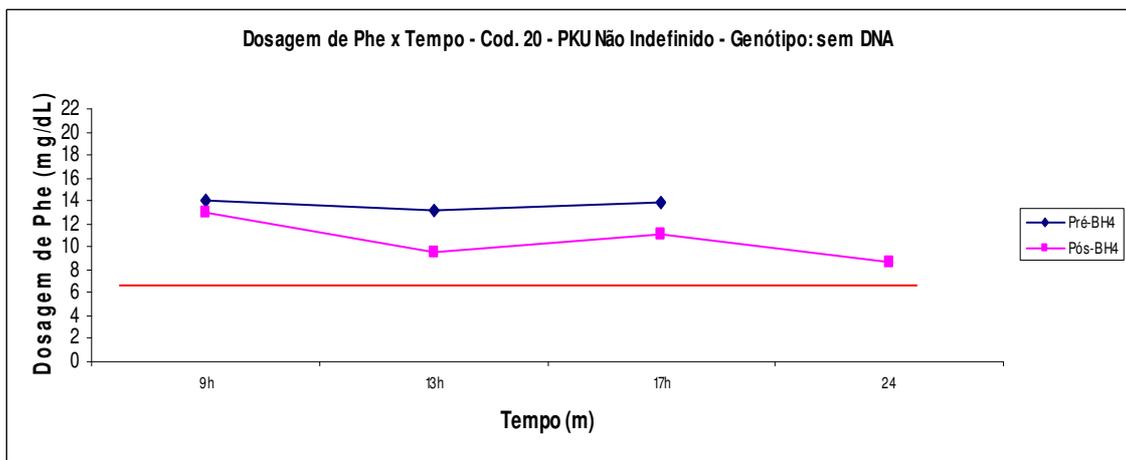
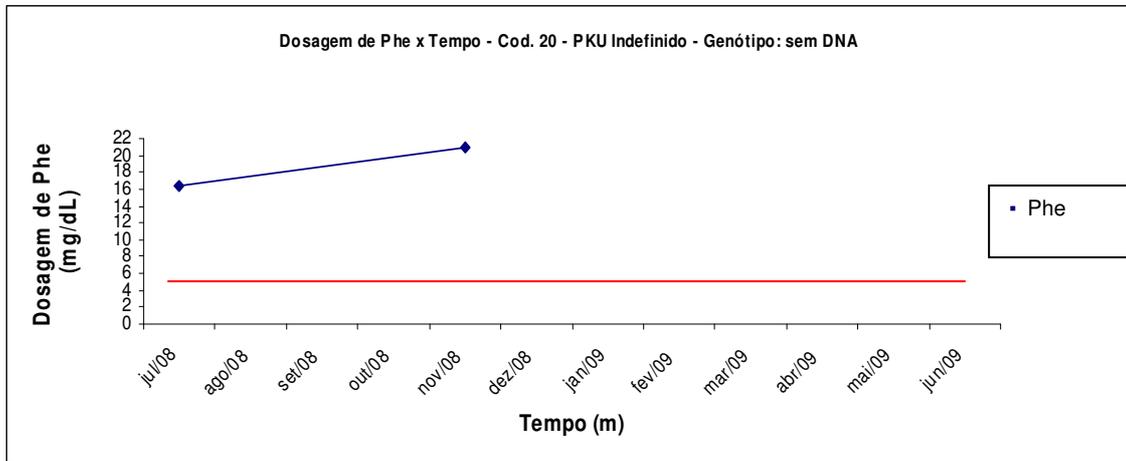
13. Paciente 17



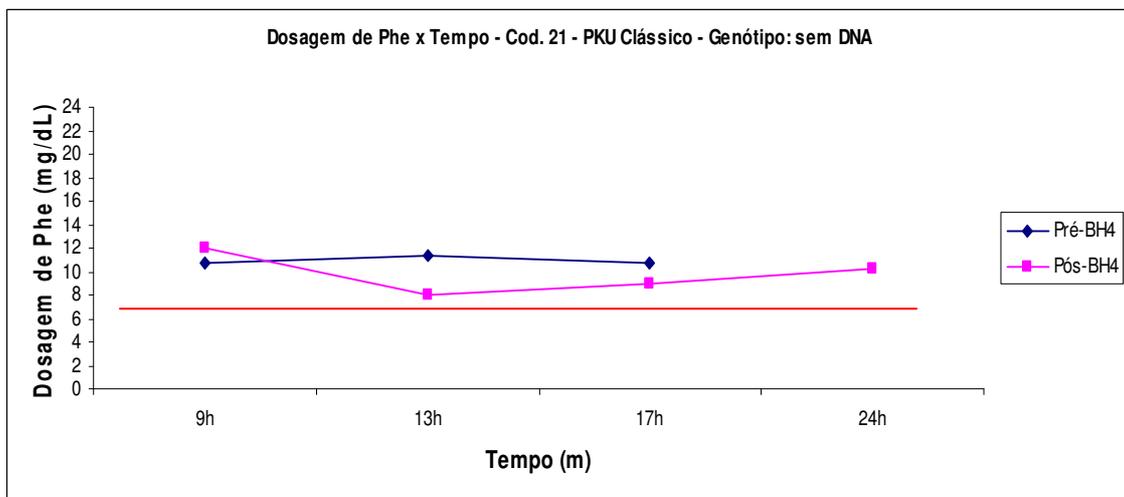
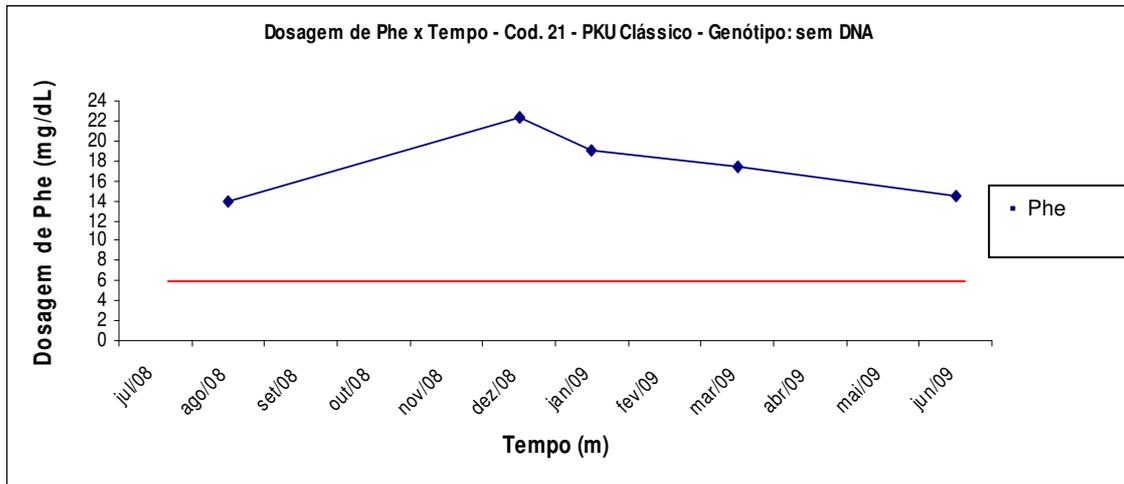
14. Paciente 19



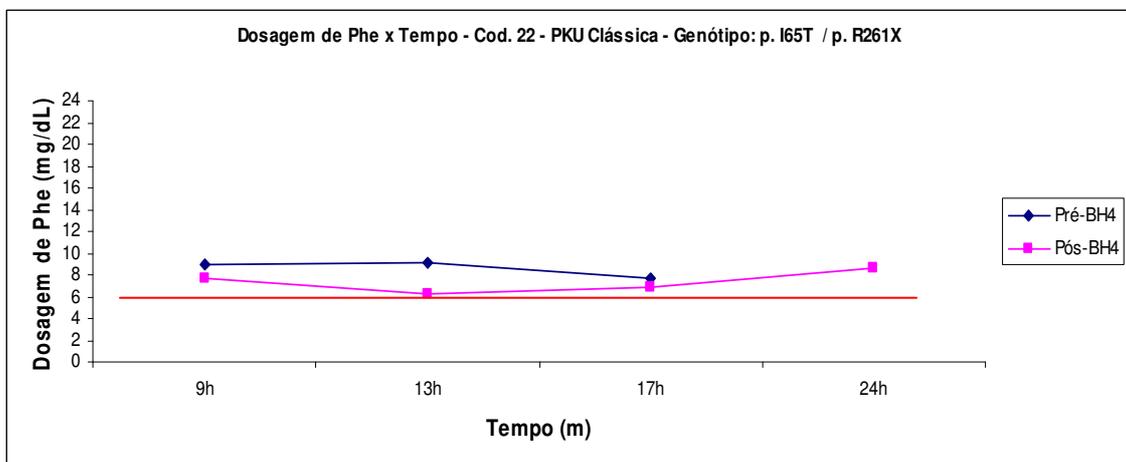
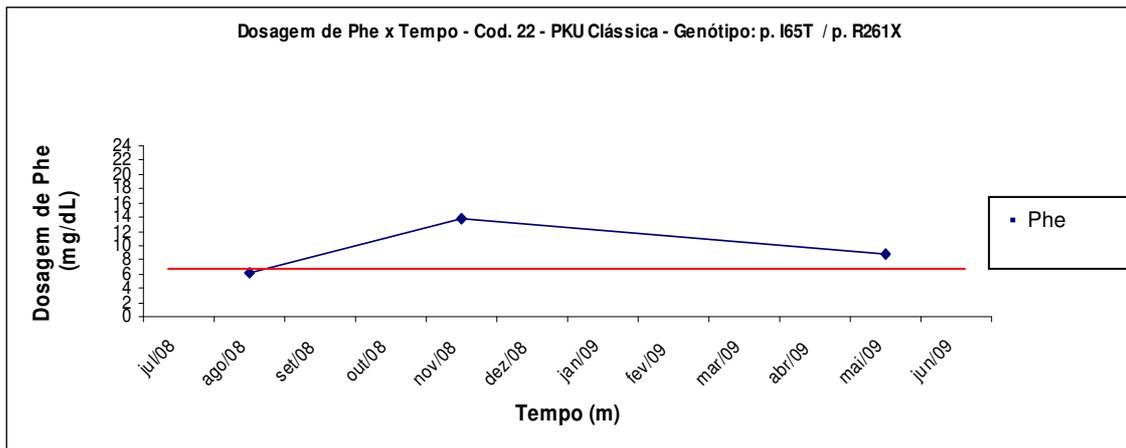
15. Paciente 20



16. Paciente 21



17. Paciente 22



18. Paciente 23

