

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

**Avaliação da responsividade ao dicloridrato de sapropterina  
(BH4) em pacientes com fenilcetonúria segundo teste de triagem  
de 24h**

ANA JAQUELLINE BERNARDO NUNES

Porto Alegre

2021

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

**Avaliação da responsividade ao dicloridrato de sopropterina  
(BH4) em pacientes com fenilcetonúria segundo teste de triagem  
de 24h**

ANA JAQUELLINE BERNARDO NUNES

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ida Vanessa Doederlein Schwartz  
Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Soraia Poloni

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

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Ana Jaquelline Bernardo

Avaliação da responsividade ao dicloridrato de sapropterina (BH4) em pacientes com fenilcetonúria segundo teste de triagem de 24h / Ana Jaquelline Bernardo Nunes. -- 2021.

36 f.

Orientadora: Ida Vanessa Doederlein Schwartz.

Coorientadora: Soraia Poloni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Fenilcetonúrias. 2. Responsividade. 3. BH4. 4. Tetrahydrobiopterina. I. Schwartz, Ida Vanessa Doederlein, orient. II. Poloni, Soraia, coorient. III. Título.

*“Você ficará agradavelmente surpreso com o que encontrará do outro lado do medo.”*  
*Lillian Colón*

## **AGRADECIMENTOS**

Início esta sessão agradecendo primeiramente a todas as belas oportunidades profissionais que a vida me proporcionou até o momento, assim como pelas pessoas que por ela passam e que tive o prazer de encontrar nessa jornada.

Meu agradecimento à professora doutora Ida Vanessa Doederlein Schwartz que aceitou ser minha orientadora desde o início e que não me permitiu desistir no momento em que o medo tomou conta, me mostrando que havia outras possibilidades. Agradeço pela paciência em me ajudar e orientar.

Agradeço à minha querida co-orientadora, doutora Soraia Poloni, que com muita maestria me orientou, corrigiu, deu suporte técnico-científico em nutrição e Erros Inatos do Metabolismo, mesmo muito atarefada, e que mostra diariamente sua capacidade como nutricionista e pesquisadora. És exemplo!

Agradeço à incrível nutricionista mestre Lilia Farret Refosco por toda parceria, acolhimento e ensinamentos como nutricionista e como ser humano frente aos pacientes com Erros Inatos do Metabolismo. Tua forma de acolhê-los e acompanhá-los diariamente faz toda a diferença para que sigam o tratamento.

Agradeço também à Dr.<sup>a</sup> Tássia Tonon e à equipe do CPC por me auxiliarem nos testes e organização, e aos familiares e pacientes que prontamente se deslocaram para esta oportunidade.

À Biomarin Inc.® por fornecer a medicação para que os testes fossem realizados; ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Por último mas não menos importante, à minha família pelo suporte eterno nas minhas tomadas de decisões e acolhimento nos piores momento, e aos meus amigos por todos bons momentos.

## RESUMO

**Introdução:** A fenilcetonúria (FNC) é uma doença genética, autossômica recessiva, causada por variantes patogênicas no gene *PAH*, que codifica a enzima hepática fenilalanina-hidroxilase (PAH), e foi um dos primeiros erros inatos do metabolismo (EIM) a ser diagnosticado através de triagem neonatal. A deficiência de PAH resulta no acúmulo do aminoácido fenilalanina (FAL) no sangue de indivíduos que têm essa deficiência, e a ausência ou atividade deficiente dessa enzima impede a conversão de fenilalanina, um aminoácido essencial, em tirosina (TIR). O acúmulo de FAL no organismo leva a uma neurotoxicidade com danos irreversíveis, e que só pode ser evitada se for precocemente diagnosticada e tratada. A enzima PAH tem como cofator a tetrahydrobiopterina (BH4) e, em pacientes com atividade residual da PAH, a administração de BH4 na forma de dicloridrato de sapropterina pode atuar aumentando a atividade enzimática, permitindo maior controle metabólico de pacientes responsivos. Para definir se o paciente é responsivo ao BH4 é necessária a realização de um teste no qual o paciente ingere a medicação e tem seus níveis de FAL plasmática avaliados antes e após, em variados pontos de hora. Diversos protocolos vêm sendo estudados para saber qual a melhor forma de identificar estes pacientes, porém, ainda não há consenso entre os especialistas sobre um único protocolo a ser utilizado. É recomendado que a alimentação e nível de atividade física sejam mantidos constantes durante o teste, porém, a variação natural de FAL e o seu consumo durante estes dias geralmente não são controladas nos estudos.

**Objetivo:** Avaliar a taxa de responsividade ao dicloridrato de sapropterina (BH4) de pacientes com FNC em um teste de triagem de 24h (curto) e avaliar a influência da variação natural de FAL e do seu consumo na resposta dos pacientes.

**Métodos:** Estudo retrospectivo, de base ambulatorial, com amostragem por conveniência. Foram incluídos os indivíduos com FNC acompanhados no ambulatório de tratamento de EIM do Serviço de Genética Médica do HCPA, e que realizaram o teste de triagem de responsividade preconizado pelo Ministério da Saúde (MS). O teste é realizado em 3 dias, sendo 24h após a ingestão de 20mg/kg de BH4. Os pacientes são orientados a manter a dieta usual com restrição de FAL e uso de fórmula metabólica. A adesão à dieta foi avaliada por registro alimentar nos 3 dias de teste. Dia 1: avaliada a flutuação natural de FAL (coletado pela manhã, no ponto basal em jejum de 8h, e após 8h); Dia 2: coleta basal de sangue, seguida por ingestão de 20mg/kg de BH4 em dose única. Novas coletas foram realizadas 8h e 24h após o BH4. Os pacientes foram considerados potencialmente responsivos se apresentassem uma redução >30% nos níveis de FAL em 8h e/ou 24h considerando a variação natural de FAL plasmática do dia 1, e pacientes com redução entres 28-30% na FAL eram considerados *borderline*, e avaliados quanto à concordância segundo a associação genótipo-fenótipo. Caso o genótipo destes pacientes possuísse mais de 5 pacientes testados com >50% responsivos registrados no BioPKU, tais pacientes eram considerados responsivos e nos demais casos eram considerados inconclusivos.

**Resultados:** Quinze pacientes realizaram o teste (sexo feminino = 10 (66,7%), mediana de idade= 8 anos (IQ25-75 7-10 anos), FNC clássica= 7 (46,7%), FNC leve= 8 (53,3%), mas somente 12 apresentaram boa adesão e tiveram o teste validado e foram incluídos nas

análises. Um paciente apresentou resposta *bordeline* mas sem possibilidade de ter a concordância do genótipo avaliada e o teste foi considerado inconclusivo. A mediana de flutuação natural de FAL foi de 5,9% (IQ25-75 -15,8:16,8). Quatro pacientes (33,3%) foram considerados potencialmente responsivos, todos com FNC leve, sendo três responsivos em 8h e 24h (redução de FAL plasmática=  $-75,9 \pm 20,2\%$  em 8h e  $-75,7 \pm 37,0\%$  em 24h) e um em 8h (redução de FAL plasmática de -28,7%). A variação no consumo de FAL entre D0 e D1 foi de 0% (IQ25-75 -6,6:1,0%), e igualmente 0% (IQ25-75 -0,3:12,2%) entre D1 e D2. A variação no consumo entre D0 e D1 não mostrou ter correlação com os níveis de FAL nos pontos 1, 2 e 3 pré-BH4 ( $p= 0,760$ ;  $p= 0,679$ ;  $p= 0,788$ , respectivamente), e a variação de consumo entre D1 e D2 também não mostrou ter correlação com a FAL plasmática dos pontos 4 e 5 ( $p= 0,413$  e  $p=0,733$ , respectivamente). A mediana (IQ25-75) de FAL pré e pós BH4 nos responsivos foi, respectivamente,  $316,5 \mu\text{mol/L}$  (235,2-613,9) e  $187,27 \mu\text{mol/L}$  (121,7-459,8), e nos não responsivos  $435,0 \mu\text{mol/L}$  (383,9 - 632,0) e  $399,5 \mu\text{mol/L}$  (348,1 - 548,3), respectivamente ( $p= 0,257$  e  $p=0,136$ ). Um paciente adulto apresentou dispepsia após a ingestão do BH4, teve o teste interrompido e foi não-responsivo em 8h. Considerando a flutuação natural de FAL, a concordância da predisposição do genótipo com a literatura foi de 100% entre aqueles que puderam ser comparados (9/9) e, ao não considerar a variação natural foi de 66,7% (6/9).

**Conclusão:** Este teste de triagem de 24h (curto) com correção para a variação natural de FAL identificou uma taxa de pacientes com FNC leve responsivos similar ao descrito na literatura. Novos estudos com este enfoque e com um maior número amostral devem ser realizados. O consumo de FAL deve ser controlado de forma objetiva nos dias do teste para evitar vieses na determinação da responsividade.

*Palavras chave: fenilcetonúria, hiperfenilalaninemia, responsividade, tetrahidrobiopterina, BH4, sapropterina*

## ABSTRACT

**Introduction:** Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive genetic disease caused by pathogenic variants in the *PAH* gene, which encodes the hepatic enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH), and was one of the first inborn errors of metabolism (IEM) to be diagnosed through neonatal screening. PAH deficiency results in the accumulation of the amino acid phenylalanine (Phe) in the blood of individuals who have this deficiency, and the absence or deficient activity of this enzyme impairs the conversion of phenylalanine, an essential amino acid, to tyrosine (Tyr). Phe accumulation in body leads to neurotoxicity with irreversible damage, which can be avoided if diagnosed and treated early. The PAH enzyme has tetrahydrobiopterin (BH4) as a cofactor and, in patients with residual PAH activity, the BH4 administration in form of sapropterin dihydrochloride can act by increasing the enzymatic activity, allowing greater metabolic control in responsive patients. To define whether the patient is potentially responsive to BH4, it is necessary to perform a test in which the patient ingests the medication and has their plasma Phe levels assessed before and after, at different time points. Several protocols have been studied to identify these patients, however, there is still no consensus among experts about a single protocol to be used. It is recommended that diet and physical activity levels be constantly maintained during the test, however, Phe natural variation and its consumption during these days generally are not controlled in the studies.

**Methods:** Retrospective, outpatient-based study with convenience sampling. Individuals with PKU followed at the IEM treatment ambulatory of the Medical Genetics Service of HCPA and who underwent the responsiveness screening test recommended by Brazilian Health Ministry were included. The test is performed in 3 days, 24 hours after the ingestion of 20mg/kg of BH4. Patients are instructed to maintain their usual diet with Phe restriction and use of a metabolic formula. Diet adherence was assessed by dietary records on the 3 days of the test. Day 1: Assessed the Phe natural fluctuation (collected in the morning, at baseline at 8h fasting, and after 8h); Day 2: basal blood collection, followed by ingestion of 20mg/kg of BH4 in a single dose. New collections were done 8h and 24h after BH4. Patients were considered potentially responsive if they had a greater than 30% reduction in Phe levels at 8h and/or 24h considering the natural range of plasma Phe on day 1, and patients with a 28-30% reduction in Phe were considered borderline, and evaluated for genotype-phenotype association. If the genotype had more than 5 tested patients with >50% responders registered in the BioPKU, such patients were considered responders. In other cases, patients were considered as inconclusive.

**Results:** Fifteen patients performed the test (female = 10 (66.7%)), median age = 8 years (IR25-75 7-10 years), classic PKU = 7 (46.7%), mild PKU = 8 (53, 3%), but only 12 had the test validated and were considered for analysis. One patient had borderline response but was not possible to compare the genotype concordance and had the test considered inconclusive. The median of Phe natural fluctuation was 5.9% (IQ25-75 -15.8:16.8). Four patients (33.3%) were considered potentially responsive, all with mild PKU, being three responsive at 8h and 24h (plasma Phe reduction =  $-75.9 \pm 20.2\%$  at 8h and  $-75.7 \pm 37$  in 24h) and one in 8h (plasma Phe reduction of  $-28.7\%$ ). The variation in Phe consumption between Day 0 and Day 1 was 0% (IR25-75 -11.2:22.9%), and 0% (IR25-75 -0.3:12.2%) between Day 1 and Day 2. The

variation in consumption between Day 0 and Day 1 was not correlated with Phe levels at points 1, 2 and 3 before BH4 ( $p= 0,760$ ;  $p= 0,679$ ;  $p= 0,788$ , respectively), and the variation in consumption between Day 1 and Day 2 also showed no correlation with Phe plasma at points 4 and 5 after BH4 ( $p= 0,413$  e  $p=0,733$ , respectively). The median (IR25-75) of Phe before and after BH4 in responsive was, respectively,  $316.5\mu\text{mol/L}$  (235.2-613.9) and  $187.27\mu\text{mol/L}$  (121.7-459.8), and in non-responsive  $435.0\mu\text{mol/L}$  (383.9-632.0) and  $399.5\mu\text{mol/L}$  (348.1-548.3), respectively ( $p=0.257$  and  $p=0.136$ ). One adult patient presented dyspepsia after BH4 ingestion, had the test interrupted and was non-responsive within 8 hours. Considering the Phe natural fluctuation, the agreement of genotype predisposition with the literature was 100% among those that could be compared (9/9) and, when not considering the natural variation, it was 66.7% (6/9). **Conclusion:** This 24-hour (short) screening test with correction for Phe natural range identified a rate of potentially responsive patients with mild PKU similar to the described in literature. Further studies with this focus and with a larger sample size should be carried out. Phe consumption should be objectively controlled on the test days to avoid bias in determining responsiveness.

**Key words:** *phenylketonuria, hyperphenylalaninemia, responsiveness, tetrahydrobiopterin, BH4, sapropterin*

## **LISTA DE FIGURAS**

### **CORPO DA DISSERTAÇÃO**

**Figura 1** – Esquema representativo do metabolismo da fenilalanina

**Figura 2** – Potenciais mecanismos responsáveis pela deficiência neurocognitiva observada nos doentes hiperfenilalaninémicos

**Figura 3** – Modelo de logística para teste de responsividade ao BH4 no protocolo A

**Figura 4** – Modelo de logística para teste de responsividade ao BH4 no protocolo B

**Figura 5** – Modelo de logística para teste de responsividade ao BH4 no protocolo C

**Figura 6** – Marco conceitual

### **ARTIGO EM PORTUGUÊS**

**Figura 1** – Variação natural de FAL no dia 1, FAL plasmática pré e pós BH4 e consumo de FAL durante o teste dos 12 pacientes incluídos nas análises

## **LISTA DE TABELAS E QUADROS**

### **CORPO DA DISSERTAÇÃO**

**Tabela 1** – Esquema para busca em base de dados

**Tabela 2** – Classificação dos níveis de deficiência de PAH e resumo de suas características

**Quadro 1** – Guia dietético para fenilcetonúria

### **ARTIGO EM PORTUGUÊS**

**Tabela 1** – Níveis plasmáticos de fenilalanina e percentual de redução após ingestão de 20mg/kg de BH4 com e sem a correção para a flutuação natural de fenilalanina em pacientes com fenilcetonúria

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHPR	Dihidropterina redutase
EIM	Erros Inatos do Metabolismo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FAL	Fenilalanina
FNC	Fenilcetonúria
GTPCH (I)	GTPciclohidroxilase I
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPA-PAH	Hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina-hidroxilase
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
LNAAs	<i>Large Neutral Aminoacids</i>
MS	Ministério da Saúde
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
PAL	Fenilalanina amonialiase recombinante
PAH	Fenilalanina hidroxilase
PCD	Pterina-4-carbinolamina desidratase
PCDT	Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PTPS	6-piruvil-tetrahydropterina sintase
SGM	Serviço de Genética Médica
SNC	Sistema Nervoso Central
Tyr/TIR	Tirosina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Deficiência de fenilalanina hidroxilase (fenilcetonúria).....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1 Diagnóstico .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Tratamento .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1 Dieta com restrição de fenilalanina.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2 Uso de tetraidrobiopterina (BH4).....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Os protocolos utilizados no SGM .....</b>	<b>25</b>
<b>3. MARCO CONCEITUAL.....</b>	<b>31</b>
<b>4. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>32</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Objetivo Primário .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Objetivos Secundários .....</b>	<b>33</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>
<b>7. ARTIGO.....</b>	<b>38</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>59</b>
<b>10. ANEXOS E APÊNDICES.....</b>	<b>60</b>
<b>Apêndice 1 – Orientações para realização do teste de responsividade ao BH4....</b>	<b>61</b>
<b>Apêndice 2 - Formulário para registro alimentar de 3 dias.....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....</b>	<b>67</b>
<b>Anexo 2 – Resumos e pôsteres para congressos nacionais e internacionais.....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo 3 – Fluxograma de classificação do tipo de hiperfenilalaninemia/FNC.....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (FNC) é uma doença genética, autossômica recessiva, causada por mutações no gene *PAH*, que decodifica a enzima hepática fenilalanina-hidroxilase (PAH). A deficiência de PAH resulta no acúmulo do aminoácido fenilalanina (FAL) no sangue de indivíduos que têm essa deficiência, e foi um dos primeiros erros inatos do metabolismo (EIM) a ser diagnosticado através de triagem neonatal (VOCKLEY J, 2014). A ausência (ou atividade deficiente) dessa enzima impede a conversão de fenilalanina, um aminoácido essencial, em tirosina (TIR) (BLAU N, SPRONSEN FJ, LEVY HL, 2010). A PAH catalisa a hidroxilação da FAL, incorporando no anel aromático um átomo de oxigênio. Também ocorre a redução do segundo átomo de oxigênio a água, mediante a utilização de dois elétrons doados pela BH<sub>4</sub>. Assim, na via principal, quando a L-FAL é hidroxilada a L-TIR, o cofator BH<sub>4</sub> é oxidado a dihidropteridina quinóide (qBH<sub>2</sub>) que, por sua vez, é reduzida pela dihidropteridina redutase (DHPR) numa reação dependente de NADH, sendo a FAL hidroxilase ativada novamente (YUDCOFF, 1999). Entre as mais de 1280 mutações já identificadas como afetando o gene *PAH* descritas no banco de dados PAHvb (<http://www.biopku.org>), podem ser encontradas grandes e pequenas deleções; inserções; mutações que afetam o *splicing* e que ocorrem nas junções de processamento alternativo em qualquer um dos intrões intervenientes; mutações pontuais do tipo *missense* ou *nonsense* e; polimorfismos silenciosos (GOMES, 2016). A reação catalisada pela PAH é dependente do cofator BH<sub>4</sub>, que assume o papel de co-substrato na reação de hidroxilação da FAL a TIR. A PAH é responsável tanto por preservar como por remover aFAL, apresentando um papel essencial na regulação deste aminoácido no organismo humano. Para que esta dupla função seja conseguida, a PAH apresenta uma estrutura específica e vários mecanismos de regulação (FLYDAL E MARTINEZ, 2013).

O acúmulo de FAL no organismo leva a uma neurotoxicidade com danos irreversíveis, e que só pode ser evitada se for precocemente diagnosticada e tratada. A doença pode ser identificada através do teste do pezinho e, quanto antes detectada e adequadamente tratado, menor será o dano causado (Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT), 2019). A prevalência deste EIM varia ao redor do mundo, com uma estimativa média global de 1:10.000 a 1:15.000 nascidos vivos, com maior frequência na Europa e na Ásia e menor

frequência na África e nas Américas (MORADI., 2016; CONITEC/MS, 2018). No Brasil, a incidência estimada é de 1:30.402, segundo dados do Ministério da Saúde (MS) (PCDT, 2019).

O diagnóstico de FNC é feito quando os níveis séricos de FAL encontram-se elevados, pelo menos em duas amostras diferentes, na ausência de tratamento, e os níveis de tirosina estão normais ou diminuídos, tendo sido excluídas hiperfenilalaninemia transitória, deficiências de BH4 e hiperfenilalaninemia causadas por mutações no gene *DNAJC12* (PCDT, 2019). Como a maioria dos casos de hiperfenilalaninemia é secundária à FNC, recomenda-se o início do tratamento mesmo que as outras causas não tenham sido, ainda, excluídas. Ainda, dependendo dos níveis de FAL no momento do diagnóstico, do nível de tolerância à FAL e do grau de deficiência da PAH, a FNC pode ser classificada em leve, moderada ou severa (ou FNC clássica) (VAN WEGBERG e col., 2017, PCDT, 2019).

O ponto de corte para início do tratamento varia conforme o país, ainda havendo algumas incertezas. Para garantir qualquer efeito indesejado, O *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* e a diretriz europeia para diagnóstico e tratamento de pacientes com FNC recomendam que o tratamento seja iniciado quando a criança apresentar níveis sanguíneos de FAL 6mg/dL ( $\geq 360 \mu\text{mol/L}$ ) (VAN WEGBERG e col., 2017; VOCKLEY J, 2014). De acordo com o PCDT sobre FNC do Ministério da Saúde (MS) publicado em 2019, crianças com níveis maiores ou iguais a 10 mg/dL ( $\geq 600 \mu\text{mol/L}$ ) devem começar a dieta logo que possível, idealmente entre 7 a 10 dias de vida. Níveis entre 8 mg/dL e 10 mg/dL persistentes (pelo menos em três dosagens consecutivas, semanais, em dieta normal) também indicam necessidade de tratamento (PCDT, 2019).

Ainda, a interrupção do tratamento em qualquer momento da vida prejudica o desempenho cognitivo e comportamental, sendo recomendado o controle dos níveis séricos de FAL por toda a vida (MIRA E MARQUEZ, 2000; PCDT, 2019). Pode haver também comprometimento emocional, como depressão, e complicações neurológicas, como tremores, espasticidade, ataxia e epilepsia, que iniciam na infância e progridem na adolescência (KALKANOGLU HS e cols., 2005).

Um dos maiores grupos de risco são as mulheres em idade fértil devido ao risco de embriopatia por FAL ou síndrome de FNC materna, a qual cursa com malformações cardíacas, microcefalia, anomalias vertebrais, estrabismo e deficiência mental no feto (BODAMER, 200; GAMBOL, 2007), devendo a mulher estar com os níveis de FAL controlados (abaixo de 6mg/dL), até, no mínimo, a quinta semana de gestação (PCDT, 2019).

Atualmente, o principal pilar para o tratamento da FNC consiste em restrição de FAL na dieta. Todos que tiverem FAL igual ou maior a 10mg/dL em dieta normal, e todos que apresentarem FAL entre 8 e 10mg/dL persistentes em três dosagens consecutivas e semanais, também em dieta normal, devem fazer a restrição (PCDT, 2019). A dieta deve ser totalmente isenta de alimentos de origem animal e restrita em alimentos de origem vegetal que contenham alto teor de fenilalanina, combinada com uma fórmula metabólica isenta de fenilalanina. Outro tipo de terapia que está sendo estudada e já permitida pelos órgãos responsáveis, como a *Food and Drugs Administration (FDA)* e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é o BH4 na forma de dicloridrato de sapropterina (PCDT, 2019; CONITEC/MS, 2018). Supõe-se que o BH4 atua como chaperona farmacológica, fazendo com que o paciente responsivo tenha maior tolerância à FAL e consiga ter um pouco mais de liberdade na dieta (GIUGLIANI L e cols., 2011; GUNDUZ M e cols, 2015; MARQUI ABT e cols, 2017). O BH4 deve ser administrado em grupos que têm maior urgência clínica, como mulheres em período periconcepcional e os pacientes com hiperfenilalaninemia leve ou FNC leve são os mais responsivos à terapia (BLAU e cols., 2004).

Diversos protocolos para administração do BH4 têm sido estudados e os esforços para saber qual a melhor maneira de identificar a responsividade dos pacientes, assim como o que considerar como responsivo, estão em pauta entre os especialistas (BLAU e cols., 2004). No Brasil, desde 2019, o Ministério da Saúde (MS) recomenda um protocolo de teste curto de 48h (sendo 24h após a ingestão do BH4), onde o paciente não precisa ficar internado para o teste e que considera a flutuação natural de FAL para definir a responsividade, que é uma variável pouco explorada nos protocolos e estudos. Este protocolo é utilizado atualmente de forma assistencial na instituição de origem deste trabalho. Não havendo consenso sobre qual o melhor protocolo a ser utilizado para detectar um paciente responsivo ao BH4, o objetivo deste estudo é descrever a responsividade ao BH4 em pacientes com FNC de acordo com um protocolo de triagem de 24h (curto) e avaliar influência da flutuação natural de FAL e da variação no seu consumo na resposta em uma amostra de pacientes acompanhados no Serviço de Genética Médica (SGM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações

Foram utilizadas as base de dados PubMed, Lilacs, SciELO e a base de periódicos da CAPES. Os artigos relacionados aos encontrados e que pertenciam a outras bases de dados também foram utilizados, assim como livros e consensos nacionais e internacionais. Os termos de busca foram adaptados de acordo com a base de dados utilizada.

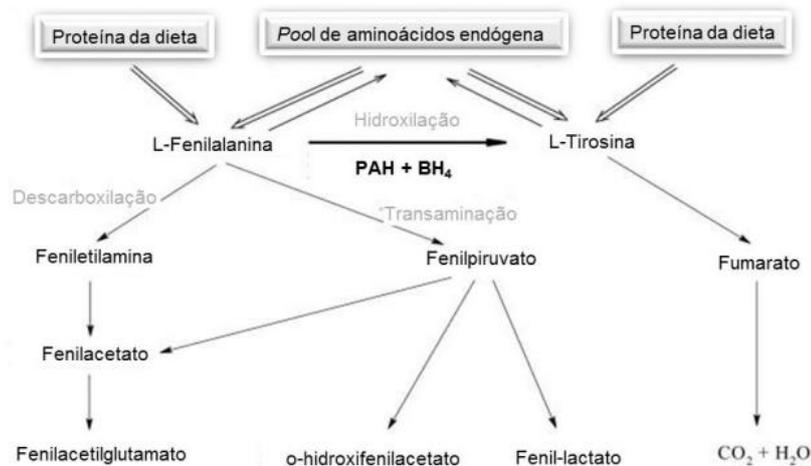
Termos de busca	PubMed	Lilacs	SciELO	Base Capes	Utilizados
<i>"phenylketonuria" OR "phenylketonuria II" OR "Dihydropteridine Reductase Deficiency" OR "Dihydropteridine Reductase Deficiency" OR "PKU" OR "Atypical PKU" OR "Hyperphenylalaninemia" OR "BH4-Deficient" OR "Phenylalanine hydroxylase deficiency"</i>	14.903 artigos	251 artigos	113 artigos	264 artigos	13
<i>"phenylketonuria" OR "phenylketonuria II" OR "Dihydropteridine Reductase Deficiency" OR "Dihydropteridine Reductase Deficiency" OR "PKU" OR "Atypical PKU" OR "Hyperphenylalaninemia" OR "BH4-Deficient" AND "tetrahydrobiopterin" OR "Phenylalanine hydroxylase cofactor" OR "kuvan"</i>	645 artigos	27 artigos	2 artigos	4 artigos	8
<i>"phenylketonuria" OR "phenylketonuria II" OR "Dihydropteridine Reductase Deficiency" OR "Dihydropteridine Reductase Deficiency" OR "PKU" OR "Atypical PKU" OR "Hyperphenylalaninemia" OR "BH4-Deficient" AND "diet"</i>	2.224 artigos	47 artigos	19 artigos	50 artigos	5

## 2.2 DEFICIÊNCIA DE FENILALANINA HIDROXILASE (FENILCETONÚRIA)

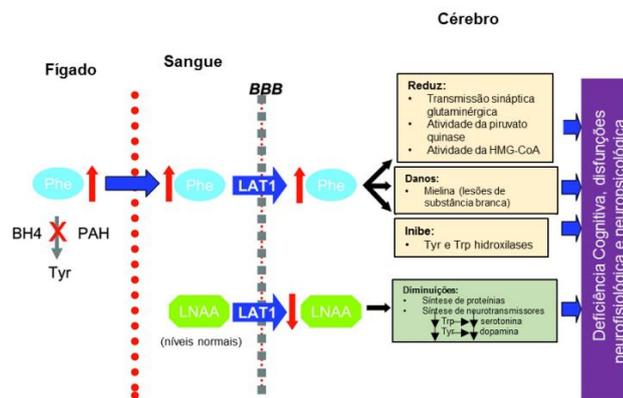
A FNC é uma doença genética, autossômica recessiva, causada por mutações no gene *PAH*, que decodifica a enzima hepática fenilalanina-hidroxilase (PAH). A deficiência de PAH resulta no acúmulo do aminoácido FAL no sangue de indivíduos que têm essa deficiência, e foi um dos primeiros erros inatos do metabolismo (EIM) a ser diagnosticado através de rastreamento populacional (VOCKLEY J, 2014). O metabolismo da FAL é descrito na Figura 1.

A doença foi descrita pela primeira vez em 1934 por Asbjorn Fölling, e entre as décadas de 1940 e 1950, descobriu-se que pacientes com FNC não têm a capacidade de metabolizar FAL e transformá-la em TIR devido a deficiência ou completa ausência da enzima PAH (NETO, 2015). Até o momento são conhecidos cinco defeitos que levam a estados de hiperfenilalaninemia: na enzima fenilalanina hidroxilase (gene *PAH*), que causa a FNC ou a hiperfenilalaninemia não-FNC, e em quatro enzimas envolvidas na síntese ou regeneração da tetraidrobiopterina (BH4), que também é cofator de enzimas envolvidas na síntese de tirosina, dopamina, serotonina, óxido nítrico e glicerol. As quatro deficiências de BH4 que cursam com hiperfenilalaninemia são deficiência de GTP ciclohidrolase I - forma autossômica recessiva (GTPCH I), deficiência de 6-piruvil-tetrahydropterina sintase (PTPS), deficiência de dihidropteridina redutase (DHPR) e deficiência de pterina-4-carbinolamina desidratase (PCD) (ZURFLÜR e cols., 2005). Mutações no gene *DNAJC12* também foram associadas, recentemente, à ocorrência de hiperfenilalaninemia (ANIKSTER Y e cols., 2017).

A patofisiologia do retardo mental causada pelos níveis altos de FAL no sangue é controversa, com hipóteses que vão desde a inibição competitiva do transporte de outros aminoácidos neutros grandes (LNAA) na barreira hematoencefálica até a deficiência de TIR, que prejudica a síntese de importantes neurotransmissores (LICHTER-KONECKI U e VOCKLEY J, 2019). O racional por trás da primeira hipótese é que, como os níveis altos de FAL são considerados neurotóxicos e os LNAA têm um sistema comum de transporte para entrar na barreira hematoencefálica, uma maior concentração destes aminoácidos poderia bloquear o transporte de FAL até o cérebro, conforme demonstrado na figura 2 (PARDRIDGE WM, 1998; VAN SPRONSEN, 2010).



**Figura 1** - Esquema representativo do metabolismo da fenilalanina (FAL). A FAL presente no organismo humano é maioritariamente proveniente da ingestão dietética. Na presença de oxigénio molecular ( $O_2$ ) ocorre a hidroxilação da FAL em -TIR pela fenilalanina hidroxilase (PAH), na presença da tetraidrobiopterina ( $BH_4$ ), o seu cofator natural. Esta via metabólica conduz posteriormente à formação de  $CO_2$  e  $H_2O$ . Por descarboxilação ou transaminação, há produção de vários metabolitos que são excretados na urina, constituindo a via alternativa ao catabolismo da L-Phe (GOMES, 2016).



**Figura 1.2** - Potenciais mecanismos responsáveis pela deficiência neurocognitiva observada nos doentes hiperfenilalaninémicos (23). (BBB) barreira hemato encefálica; (LAT1) transportador de aminoácidos L do tipo I; (LNAA) aminoácidos neutros de maior massa molecular.

Figura 2 - Potenciais mecanismos responsáveis pela deficiência neurocognitiva observada nos doentes hiperfenilalaninémicos (traduzida por Kátia Cristina Morais Soares Gomes, 2016 de Feillet F, van Spronsen FJ, MacDonald A, e cols., 2010). (BBB) barreira hemato encefálica; (LAT1) transportador de aminoácidos L do tipo I; (LNAA) aminoácidos neutros de maior massa molecular.

O gene que codifica a PAH está localizado no cromossomo 12 (região q22-24.1), composto por 13 éxons e 12 íntrons, medindo 90kb (LIU e cols., 2017). Mais de 950 variantes de *PAH* estão associadas à deficiência da enzima, e a maioria delas (60%) é *missense* geralmente resultando em desdobramento de proteínas e/ou comprometimento de funções catalíticas (MARQUI, 2017). Fazer a genotipagem não é essencial para o diagnóstico de FNC, mas pode determinar a grau de disfunção da proteína, atividade residual da PAH e,

consequentemente, o fenótipo metabólico (VAN WEGBERG e col., 2017). O trabalho de Zurflür e colaboradores (2008) analisou o genótipo de 315 pacientes responsivos ao BH4 do banco de dados BIOPKU (banco de dados que concentra informações sobre genótipos de pacientes com hiperfenilalaninemias e dados de responsividade e fenótipos, disponível em <http://www.biopku.org>) e comparou com o banco de dados *PAHdb* e com demais dados publicados de mutações no gene *PAH* de países europeus, norte da China e Coreia do Sul. Foram identificadas 57 mutações que apresentavam atividade residual da enzima (aproximadamente 47%), presumindo-se que estes achados estivessem relacionados com a responsividade ao BH4. Mais de 89% dos pacientes eram heterozigotos compostos e as três mutações mais frequentes e encontradas em mais de 5% dos pacientes responsivos ao BH4 foram p.Ala403Val, p.Arg261Gln e p.Tyr414Cys. Os autores concluíram que a genotipagem poderia identificar melhor os pacientes responsivos do que o teste de sobrecarga (Zurflür, 2008), porém, dados recentes revelam que independente do genótipo, todos os pacientes devem ser testados, com exceção daqueles que tenham duas mutações nulas (MUNTAU e cols., 2019).

A diretriz europeia de FNC indica que os pacientes que têm um genótipo conhecido como não responsivo não devem ser submetidos ao teste de sobrecarga ao BH4, e que aqueles com o genótipo de responsividade talvez possam receber um “tratamento teste” ao invés de um teste de sobrecarga (VAN WEGBERG e col., 2017). Todos os demais pacientes devem ser submetidos ao teste de sobrecarga com BH4. Já a diretriz americana diz que a análise da mutação deve ser obtida de todos os pacientes com FAL aumentada, a fim de obter informações que podem influenciar na restrição dietética, na resposta à suplementação do cofator (BH4) (VOCKLEY J, 2014). Assim como na Europa e na América do Norte, no Brasil a genotipagem é realizada também a fim de auxiliar nas melhores escolhas no tratamento do paciente, e não é obrigatória para realizar o diagnóstico, além de ser um teste não coberto pelo SUS (PCDT, 2019).

No Brasil, a triagem neonatal para hiperfenilalaninemias começou na década de 1970 e, em 1990, o Estatuto da Criança e do Adolescente (Lei 8069/1990) definiu a triagem neonatal como obrigatória. Em 2001, foi criado o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN). Desde então, a triagem neonatal para hiperfenilalaninemias foi ampliada e hoje cobre todo o país, porém, sabe-se que ainda há falhas na realização do teste em algumas localidades (LEÃO E AGUIAR, 2008), uma vez que o teste é realizado em 80% da população brasileira (GOVERNO FEDERAL, 2021).

### 2.2.1 DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico no Brasil, a Triagem Neonatal realiza a dosagem quantitativa da FAL sanguínea em amostras colhidas em papel-filtro. A coleta deve ser feita somente após 48 horas e em até cinco dias após o nascimento, pois, para que o aumento da FAL possa ser detectado, é fundamental que a criança tenha ingerido uma quantidade suficiente de proteína. Nesse momento, mesmo as crianças de risco, que ainda não tiveram contato com leite materno, podem ter o sangue colhido, desde que estejam em dieta parenteral (rica em aminoácidos essenciais) (Manual técnico de triagem neonatal biológica, MS, 2016; PCDT, 2019). Os métodos laboratoriais utilizados para medir FAL incluem, por exemplo, espectrometria de massa em *tandem*, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), testes enzimáticos e fluorimétricos, podendo, a depender do método, ser utilizado sangue coletado em papel-filtro e/ou plasma para as análises. As coletas em papel-filtro são consideradas métodos de triagem, e não de diagnóstico (PCDT, 2019).

Devido às diversas mutações genéticas encontradas em pacientes com FNC, uma gama de fenótipos é possível de ser encontrada, assim como suas manifestações clínicas e gravidade da doença. Existem várias formas de classificação da FNC, e os critérios geralmente incluem as concentrações plasmáticas da FAL no diagnóstico (paciente ainda sem tratamento), na tolerância à FAL e no grau de deficiência da PAH (PCDT, 2019). A classificação adotada pelo Ministério da Saúde é mostrada na tabela 1 e o protocolo do SGM-HCPA é demonstrado no anexo 3.

**Tabela 1. Classificação dos níveis de deficiência de PAH e resumo de suas características**

<b>Tipo</b>	<b>Clínica/Bioquímica</b>	<b>Tratamento</b>
Clássica	O paciente apresenta níveis plasmáticos de FAL acima de 20 mg/dL (1.200 µmol/L) no diagnóstico (sem tratamento).	Monoterapia com tratamento dietético ou terapia combinada de dieta + suplementação de BH4, se paciente for responsivo.
Leve	O paciente apresenta níveis plasmáticos de FAL entre 8 mg/dL e 20 mg/dL (360 a 1.200 µmol/L) no diagnóstico (sem tratamento);	Monoterapia com tratamento dietético ou terapia combinada de dieta + suplementação de BH4, se paciente for responsivo.
Hiperfenilalaninemia não-FNC	O paciente apresenta níveis plasmáticos de FAL entre 2 mg/dL e 8 mg/dL (120 a 480 µmol /L) no diagnóstico (sem tratamento)	Monoterapia com tratamento dietético ou terapia combinada de dieta + suplementação de BH4, se paciente for responsivo.
Hiperfenilalaninemia transitória	Paciente apresenta níveis plasmáticos de FAL <10mg/dL (<600 µmol/L) sem tratamento, mas é causada por imaturidade hepática	Não necessita de tratamento pois os níveis tendem a diminuir nos primeiros meses de vida e o desenvolvimento neuropsicomotor é normal.

FNC= fenilcetonúria

Fonte: PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS – FENILCETONÚRIA. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC). Ministério da Saúde, 2019.

O diagnóstico de FNC é feito quando os níveis séricos de FAL encontram-se elevados, em pelo menos duas amostras diferentes, na ausência de tratamento, e os níveis de tirosina estão normais ou diminuídos, tendo sido excluídas hiperfenilalaninemia transitória, deficiências de BH4 e hiperfenilalaninemia causadas por mutações no gene *DNAJC12*. Como a maioria dos casos de hiperfenilalaninemia é secundária à FNC, recomenda-se o início do tratamento mesmo que as outras causas não tenham sido, ainda, excluídas (PCDT, 2019). O diagnóstico de hiperfenilalaninemia transitória é feito geralmente a partir do sexto mês de vida em pacientes com diagnóstico prévio de FNC e que, gradualmente, tiveram aumento da tolerância à ingestão de FAL até níveis considerados normais para a faixa etária (PCDT, 2019).

Elevados níveis de FAL plasmática em mulheres grávidas, definida como FNC materna, são prejudiciais ao bebê, podendo ocasionar déficit cognitivo, malformações congênitas, como microcefalia, malformações cardíacas, estrabismo e alterações vertebrais (embriopatia por FNC materna), sendo a FAL considerada um agente teratogênico (GAMBOL PJ, 2007; MIRA E MARQUEZ, 2000). As concentrações de FAL plasmática devem, idealmente, ser mantidas entre 2 e 6 mg/dL da pré-concepção em diante, requerendo uma educação continuada desde a infância (VAN WEGBERG e col., 2017; PCDT, 2019).

### 2.3 TRATAMENTO

A FNC não tem cura, e seu tratamento tem como objetivo manter os níveis sanguíneos de FAL <10mg/dL (<600 µmol/L), e níveis entre 2 e 6mg/dL (120 a 360 µmol/L) estão associados com melhores desfechos. Não existe consenso internacional quanto ao ponto de corte para o tratamento da FNC, variando entre 6 mg/dL a 7 mg/dL no Reino Unido, 10 mg/dL na Alemanha e França. A diretriz norte-americana (2014) traz que, como os níveis entre 6 e 10mg/dL (360 e 600 µmol/L) apresentam estudos controversos quanto ao desfecho neurocognitivo nesta faixa, recomenda-se tratar todos os indivíduos com FAL sanguínea acima de 6 mg/dL (360 µmol/L). O tratamento deve ser mantido durante toda a vida do indivíduo, causando consequências neurológicas irreversíveis se não for feito adequadamente. Atualmente, 3 tipos de terapia estão disponíveis para o tratamento da FNC e outros 3 estão em estudo (VOKCLEY 2019; VOCKLEY J e cols., 2014).

A dieta com baixo teor de FAL foi o primeiro tratamento a ser instituído e a ter resultados, e é a monoterapia mais utilizada desde então. Com o decorrer do tempo, outras tecnologias foram descobertas e podem ser associadas à dieta, como é o caso do cofator da enzima PAH, o BH4 (sapropterina), que atua como uma chaperona terapêutica (VOKCLEY 2014), levando a uma melhora do desdobramento e da estabilidade da enzima mutante (VOKCLEY 2019). Outra terapia farmacológica que vem sendo estudada desde 1980 é a terapia de substituição enzimática com FAL amônia liase recombinante (PAL), que atua substituindo uma função da PAH. A terapia de reposição enzimática para FNC apresenta-se como uma opção terapêutica para redução dos níveis séricos de FAL, através da introdução de enzimas metabolizadoras daquele aminoácido, sendo capazes de alterar o fenótipo metabólico da FNC, independentemente do genótipo (STRISCIUGLIO, 2014; GOMES, 2016). Ela atua catalisando a desaminação da FAL em amônia livre e ácido trans-cinâmico. A Pegvaliase (nome dado à enzima após combinação necessária com polietileno glicol para estabilizá-la) foi aprovada pelo FDA, nos EUA, em maio de 2018, para uso em pacientes com níveis não controlados de FAL e ainda não teve sua segurança testada em mulheres grávidas, além de ainda não estar disponível no Brasil. Vale destacar que é não é usual encontrar pacientes que responderão ao tratamento somente com a terapia farmacológica disponível atualmente, o BH4. Ou seja, sem o uso da dieta com baixo teor de FAL e suplementação com fórmula metabólica, dificilmente haverá controle metabólico (VOKLEY, 2019).

### **2.3.1 Dieta com restrição de fenilalanina**

Segundo o PCDT do Ministério da Saúde (2019), deverão fazer uso de dieta restrita em FAL todos os pacientes com nível de FAL maior ou igual a 10 mg/dL em dieta normal e todos os que apresentarem níveis de FAL entre 8 mg/dL e 10 mg/dL persistentes (pelo menos em três dosagens consecutivas, semanais, em dieta normal).

O objetivo da dieta é fornecer proteína natural suficiente (juntamente com a fórmula de aminoácidos isenta de FAL) para que o paciente seja saudável e cresça normalmente, ao mesmo tempo em que mantém os níveis sanguíneos de FAL dentro dos limites recomendados. O principal suporte para este controle metabólico é o uso de uma dieta totalmente isenta de produtos de origem animal e restrita em alimentos de origem vegetal que contenham alto teor de fenilalanina, combinada com o uso de uma fórmula de aminoácidos (ou hidrolisados de proteína) isenta de fenilalanina. Sem o uso desta fórmula, as quantidades de proteínas,

calorias, vitaminas e sais minerais não seriam possíveis de ser alcançados em uma dieta restrita em FAL. A fórmula é a principal fonte de proteína no manejo da FNC, e é utilizada desde muito cedo, assim que feito o diagnóstico, e de preferência nos primeiros 7 a 10 dias de vida, e deve ser utilizada durante a vida adulta também (VOCKLEY, 2019; PCDT, 2019; STRISCIGLIO, 2014; VOCKLEY e cols., 2014).

As fórmulas devem ser encaradas como um medicamento na rotina do paciente com FNC e as mesmas devem conter as quantidades adequadas de vitaminas e sais minerais adequadas à faixa etária do paciente, seguindo as recomendações da ANVISA. A prescrição da fórmula varia conforme a idade e o peso do paciente, e supre cerca de 50 a 85% do consumo proteico total (PCDT, 2019). Da mesma forma, a quantidade de FAL e de TIR da dieta devem ser adequados de acordo com a faixa etária, uma vez que a criança está em constante crescimento. De qualquer forma, os níveis sanguíneos de FAL e de TIR é que serão os norteadores para qualquer alteração na dietoterapia (VOCKLEY e cols., 2014).

Devido à menor biodisponibilidade dos aminoácidos provenientes da fórmula, a ingestão proteica deve ser maior do que as recomendações vigentes para a população. Um adicional de pelo menos 20% a 40% deve ser incluído à prescrição quando a fonte proteica for a fórmula de aminoácidos (PCDT, 2019; VOCKLEY e cols., 2014).

Para prescrever e explicar a dieta de forma mais simplificada, é utilizado um esquema de alimentos permitidos, controlados e proibidos, como mostra o quadro 1.

### Quadro 1: Guia dietético para fenilcetonúria

<b>Permitidos</b>	<b>Controlados</b>	<b>Proibidos</b>
Não é necessário cálculo do conteúdo de FAL para consumo de alimentos deste grupo.	Alimentos deste grupo contêm níveis médios de fenilalanina, devendo seu conteúdo ser calculado acuradamente conforme orientação do nutricionista. Pesas a comida ou utilizar medida caseira após cozinhar.	Alimentos deste grupo contêm altos níveis de FAL e não devem ser consumidos por pacientes com FNC.
Frutas: maioria das frutas, com exceção de figos secos.	Frutas: banana, abacate, maracujá, frutas secas.	Todos os tipos de carne, peixe, ovos e frutos do mar.
Vegetais: maioria dos vegetais, pickles em vinagre.	Vegetais: batatas, aipim, batata doce.	Oleaginosas, soja, lentilha, ervilha, feijão, leite e produtos feitos destes alimentos.
Gorduras: manteiga, margarina, toucinho, óleos e gorduras vegetais.	Grãos: arroz.	Laticínios animais: leite, queijos, sorvete, cremes.

Bebidas: limonada, café, chá, água mineral, leite de coco, leite de arroz, sucos de frutas e refrigerante sem aspartame.		Leites vegetais e subprodutos à base de soja, amêndoas, amendoim, aveia, castanhas, nozes e demais. oleaginosas.
Açúcares: refinados, balas de frutas e gomas, mel, pirulitos, geleias de frutas, tapioca, sagu, polvilho.		Cereais como trigo, aveia, cevada, centeio, sorgo, milho e produtos feitos destes alimentos, como pães, massas, bolos, biscoitos.
		Chocolate e achocolatados.
		Aspartame.

Fonte: British Inherited Metabolic Diseases Group (EVANS, 2019), adaptado e disponível no Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas, 2019.

### 2.3.2 Uso de tetraidrobiopterina (BH4)

Em 2007 foi aprovado pela FDA, nos EUA, o dicloridrato de sapropterina para tratamento da PKU., que é a forma sintética da tetraidrobiopterina (BH4), um cofator natural da fenilalanina hidroxilase (VOCKLEY, 2019). Desde então, diversos países passaram a adotar o teste de responsividade ao BH4 de seus pacientes com FNC. O benefício do BH4 para os pacientes está na possibilidade do aumento da tolerância à FAL consumida, permitindo que a dieta seja um pouco mais flexível e tenha maior aderência ao tratamento. Embora não sejam deficientes em tetraidrobiopterina (BH4), aproximadamente 30% dos pacientes com deficiência de PAH respondem à administração de BH4 com aumento do metabolismo de FAL para TIR (CONITEC/MS, 2018).

A responsividade ao BH4 é multifatorial e vai depender da mutação genética da enzima PAH em cada paciente (KURE e cols., 1999). O cofator atua estabilizando a enzima mutante, e, naqueles pacientes onde não há atividade enzimática residual, o cofator não tem como agir. Apesar de o genótipo ter grande influência no grau de responsividade, não é suficiente para prever quem terá sucesso ou não. Devido isso, os pacientes devem ser testados, e os critérios para a realização do teste variam de país para país (CONITEC/MS, 2018).

O cloridrato de sapropterina tem efeitos colaterais, os quais devem ser levados em consideração, principalmente em gestantes. Apesar dos efeitos colaterais nesta população, ao pesar os prós e os contras, ficou definido que as mulheres com FNC que podem utilizar o BH4 são aquelas que foram testadas previamente, uma vez que os danos causados no embrião

e no feto pelos altos níveis de FAL são graves e permanentes (VOCKLEY, 2019; MIRA E MARQUEZ, 2000).

A recomendação para o uso do BH4 varia conforme o país. No Canadá o paciente precisa ter uma série de critérios para ser submetido ao uso, assim como no Brasil. Na Austrália, apenas pacientes com hiperfenilalaninemia por deficiência de BH4 podem ser submetidos ao tratamento; na Escócia, pacientes adultos e pediátricos com FNC ou para os que têm deficiência de BH4; já na Inglaterra, não é previsto o uso de sapropterina no tratamento da FNC pelo sistema público (National Health Service (NHS UK, 2020). Uma vez que a evidência disponível para os desfechos de maior relevância ser de qualidade moderada, existe recomendação fraca a favor da inclusão da sapropterina no SUS como tratamento complementar na FCN para pacientes responsivos à mesma (CONITEC/MS, 2018).

Após reunião plenária e consulta pública, em 2019 definiu-se pela incorporação do dicloridrato de sapropterina para o tratamento de mulheres com FNC, com teste de responsividade positivo ao medicamento, e que estejam no período pré-concepcional ou em período gestacional, mediante negociação de preço e conforme o PCDT do Ministério da Saúde, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS. Dada pela Portaria nº 78, publicada no DOU nº 241, seção 1, página 77, em 17 de dezembro de 2018 (CONITEC/MS, 2018).

Um dos motivos para a divergência entre profissionais e órgãos de saúde de diferentes países, é a dificuldade em definir se o paciente é responsivo ou não. O teste de responsividade é feito inicialmente a fim de identificar aqueles que possam ser responsivos, e, caso positivo, a suplementação é feita em um período maior, e só assim será possível afirmar que um paciente é realmente responsivo e que se beneficiará da suplementação. Existem protocolos onde a resposta ao BH4 é avaliada em 48h ou em 7 dias, em variados pontos de hora neste intervalo. O teste de triagem de 24h pode ser uma alternativa mais curta, com o mesmo potencial de identificação de responsivos e com maior custo-efetividade para pacientes e sistemas de saúde. Pacientes identificados como responsivos em um teste de triagem devem ser submetidos a um teste longo de 6 meses (MUNTAU e cols., 2019).

Os estudos têm utilizado diferentes protocolos para avaliar a responsividade: diferentes doses de BH4 (10 ou 20 mg/kg/dia, em uma dose única ou distribuída durante o dia); o período de avaliação do teste varia de algumas horas, para semanas ou até meses; Muitos países adotam como ponto de corte a redução de 20% a 30% de redução da FAL sanguínea após a ingestão do BH4 (CONITEC/MS, 2018). Diferentes pontos de hora são então testados para avaliar se houve resposta ou não, e, ainda, identificar aqueles que

respondem mais rápido e os que têm resposta tardia, como é o caso de pacientes com genótipos mais graves.

Muntau e colaboradores (2002) utilizaram um protocolo de sobrecarga de 100mg/kg FAL combinado com 20mg/kg de BH4. Os pacientes receberam 100mg/kg de FAL através de uma refeição e 1h após ingeriram 20mg/kg de BH4. Os níveis de FAL foram avaliados antes da sobrecarga de FAL e 4, 8 e 15h após a sobrecarga com BH4. Após 6 a 8 horas, os pacientes receberam outra refeição com 10mg/kg de FAL. Os autores consideraram como responsivos aqueles que reduziram mais de 30% da FAL plasmática após 15h da sobrecarga com o BH4. Dos 31 pacientes com hiperfenilalaninemia não-FNC ou com FNC leve, 27 (87%) foram responsivos. A oxidação de FAL esteve aumentada em 23 destes 31 pacientes (74%). Os que tinham FNC clássica não foram responsivos. A magnitude de redução de FAL após 15h da ingestão do BH4 variou de 37% a 92% (MUNTAU e cols., 2002).

O protocolo proposto por Blau e colaboradores (2004) consiste em administrar 20mg/kg/dia de BH4 em pacientes com níveis de FAL >400 micromol/L após 3h de jejum. A FAL e TIR devem ser medidas no plasma ou no sangue 4h, 8h e 24h após a administração do BH4 e a urina coletada antes de 4-8h após o BH4, a fim de controlar a absorção intestinal da medicação. É considerado responsivo o paciente que tiver mais de 30% de redução da FAL plasmática após 8h ou mais de 50% 24h após a administração BH4. Usando este protocolo, 60-70% dos pacientes com hiperfenilalaninemia e FNC leve tiveram sucesso. Shintaku e colaboradores adaptaram esse protocolo e adicionaram uma dose de BH4 24h após as primeiras 24h (48h após a ingestão do BH4) e conseguiram identificar os pacientes com resposta lenta, como os com FNC/HFA moderada (BLAU E ERLANDSEN, 2004). Para alguns pacientes 8h são suficientes para detectar uma melhora, enquanto que para responsivos lentos é necessário um protocolo mais longo (DHONT e cols., 2003).

## 2.4 PROTOCOLOS UTILIZADOS NO SGM

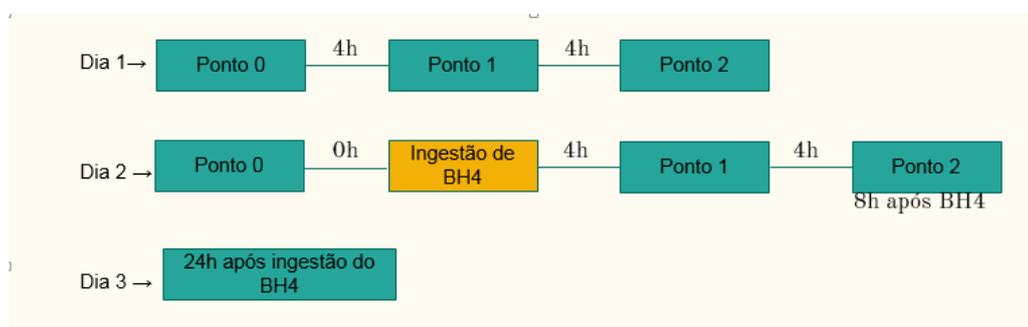
Desde 2011 foram testados 3 protocolos diferentes no SGM do HCPA, onde dois foram protocolos de estudos e um é utilizado de forma assistencial desde 2019, conforme estabelecido pelo CONITEC. A seguir, serão apresentados.

Protocolo A – Giugliani e colaboradores, 2011

Estudo intervencional e com amostragem por conveniência. Para serem incluídos no estudo, os pacientes deveriam possuir diagnóstico bioquímico de hiperfenilalaninemia por deficiência de fenilalanina hidroxilase (HPA-PAH); ter idade  $\geq 7$  anos (por serem mais colaborativas); estar em tratamento dietético; e apresentar níveis de FAL  $\geq 6$  mg/dL em todas as medidas realizadas no ano anterior à inclusão no estudo (valores mais altos e que representam menor adesão). Os níveis de FAL foram determinados por meio de espectrometria de massas *in tandem* no dia anterior (dia 1) e nos pontos de hora 0h, 4h e 8h (dia 2) e 24h (dia 3) após ingestão de BH4. Os critérios utilizados para definir responsividade ao BH4 foram: critério 1- redução  $\geq 30\%$  de Phe após 8h da administração de BH4; e critério 2- redução  $\geq 30\%$  de Phe após 24h da administração.

O tipo de HPA-PAH foi classificado de acordo com o nível de FAL plasmática ao diagnóstico (sem tratamento), critério adotado pelo ATDM-SGM/HCPA: FNC clássica (FAL  $\geq 20$  mg/dL); FNC leve (FAL entre 6 e 20 mg/dL); e HPA não FNC (FAL entre 2 e 6 mg/dL). Aqueles pacientes com dados ausentes e/ou duvidosos foram considerados “PKU indefinido”.

No primeiro dia (dia pré-BH4 ou dia 1), os pacientes foram submetidos a coletas de sangue às 8/12/16h ou 9/13/17 h (ponto 0/ ponto 1/ ponto 2, respectivamente), para avaliar a variação dos níveis de FAL. No segundo dia (dia 2), foi aplicado um protocolo modificado do teste de sobrecarga com BH4, com administração oral de uma única dose de 20 mg/kg de BH4 em todos os pacientes. As coletas de sangue no dia 2 foram realizadas nos pontos de hora 0, 4 e 8 h (ponto 0 ou basal, ponto 1 e ponto 2, respectivamente), após a ingestão do medicamento. A coleta de sangue no dia 3 foi realizada 24 h após a ingestão do medicamento (ponto 3).



**Figura 3.** Modelo de logística para teste de responsividade ao BH4 no protocolo A – Giugliani e colaboradores (2011).

## Protocolo B – Nalin e colaboradores, 2011

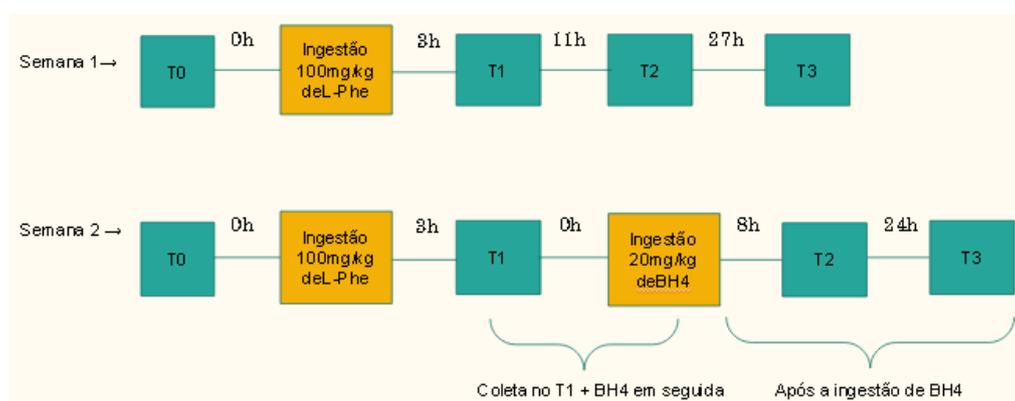
Foram incluídos pacientes com idade  $\geq 4$  anos, em tratamento dietético e que possuíam mediana de FAL plasmática inferior a 10mg/dL no ano anterior a inclusão. Os critérios de exclusão foram: gestação, presença de manifestações clínicas sugestivas de hepatopatia; uso de levodopa; alergia a algum dos componentes do BH4; mediana do nível de Phe  $>600$  micromol/L ( $>10$ mg/gL) nos últimos 12 meses; e provável não-cooperação com os procedimentos do estudo, de acordo com o julgamento dos investigadores.

Foram realizados testes de sobrecarga simples de FAL, utilizando 100mg/kg de L-FAL (Teste 1) e teste combinado de FAL+BH4, utilizando 100mg/kg de L-FAL e 20mg/kg de BH4 (teste 2), com intervalo de uma semana entre ambos. A ingestão do BH4 ocorreu após três horas da ingestão da FAL. Foram realizadas coletas de sangue no ponto basal e após 3, 11 e 27h após a ingestão de FAL (T0, T1, T2 e T3 dos testes 1 e 2, respectivamente).

Teste 1: após jejum noturno, foi realizada coleta de sangue dos pacientes para a medida da concentração plasmática de FAL e Tyr (T0). Em seguida, os pacientes ingeriam 100mg/kg de L-FAL e retornaram, então, sua alimentação habitual (dieta restrita em FAL + fórmula metabólica). Coletas para a dosagem de FAL e Tyr foram então realizadas em 3h (T1), 11h (T2) e 27h (T3) após a sobrecarga de FAL.

Teste 2: foi aplicado protocolo descrito por Blau et al. Com uma modificação –os níveis de FAL e Tyr não foram analisados 7 horas após a sobrecarga de FAL. As etapas iniciais do teste 2 (T0, sobrecarga de FAL, início da alimentação e coleta no T1) foram semelhantes àquelas descritas no teste 1. Logo após a coleta no T1, foi administrada VO uma dose única de 20mg/kg de BH4 e as coletas de sangue para análise de FAL e Tyr foram realizadas 8h (T2) e 24h (T3) após a ingestão do BH4. Os pontos de T0 e T1 dos testes 1 e 2 são equivalentes, ao contrário dos pontos 2 e 3, os quais diferem em relação à administração de BH4 (presentes no teste 2).

Os testes aqui foram realizados todos no mesmo dia, um dia para cada teste.



**Figura 4.** Modelo de logística para teste de responsividade ao BH4 no protocolo B – Nalin e colaboradores (2011).

Para ser considerado responsivo, o paciente deveria apresentar evidência de redução dos níveis de FAL associada à administração do BH4 de acordo com pelo menos um dos seguintes critérios:

Critério A – análise das diferenças, em percentual, dos valores de FAL nos pontos T1 e T2 dos testes 1 e 2;

Critério B – análise das diferenças, em percentual, dos valores de FAL nos pontos T1 e T3 dos testes 1 e 2;

Critério C – análise da diferença, em percentual, das áreas abaixo da curva de FAL entre os testes 1 e 2.

A classificação da responsividade foi também comparadas com quatro critérios adicionais:

Critério D – análise da diferença, em percentual, dos valores de FAL nos pontos T1 e T2 do teste 2;

Critério E – análise da diferença, em percentual, dos valores de FAL nos pontos T1 e T3 do teste 2; cinco pacientes também participaram do estudo de Giugliani e cols. (2011) e foram também classificados através do critério F – análise da diferença, em percentual dos valores de FAL após 8h da sobrecarga simples com BH4 e do critério G – análise da diferença, em percentual, dos valores de FAL após 24h da sobrecarga simples com BH4. Para todos os critérios foi utilizado como ponto de corte redução de >30%.

O ponto de corte para Phe inicial (<10mg/dL) foi adotado para permitir a realização do teste em pacientes com a forma leve da doença e/ou com bom controle metabólico, uma vez que o estudo anterior incluiu predominantemente pacientes com a forma clássica da doença e com controle metabólico inadequado. O consumo de FAL foi feito por meio de inquérito

alimentar realizado no dia anterior e no primeiro dia dos Testes 1 e 2, totalizando dois inquéritos por teste.

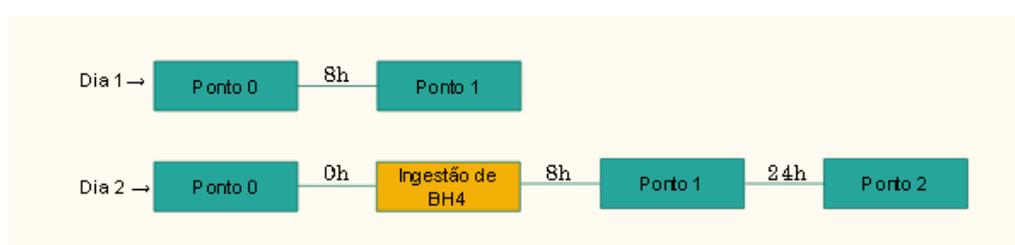
Protocolo C - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC), 2019

A responsividade ao dicloridrato de sapropterina é avaliada por um teste ambulatorial, conduzido no período de dois dias (48 horas de teste, das quais 24 horas ocorrem após sobrecarga com dicloridrato de sapropterina). No primeiro dia são realizadas coletas de sangue para avaliar a flutuação de FAL plasmática do paciente. Para isso, é coletada uma amostra de sangue no ponto basal (ou seja, P0 - dia 1) e realizada uma nova coleta após 8 horas (P1 - dia 1). No segundo dia é feita a sobrecarga com dicloridrato de sapropterina. Primeiramente, é realizada uma coleta de sangue considerada o ponto basal em relação à ingestão do dicloridrato de sapropterina (P0 - dia 2) e, logo após, o paciente ingere uma dose única de 20 mg/kg juntamente com água. Novas coletas de sangue são realizadas após 8 horas (P1 - dia 2) e 24 horas em relação à ingestão do medicamento (P2 - dia 2). Para realização do teste, a FAL plasmática basal não pode ser inferior a 3 mg/dL.

Crítérios de inclusão: pode ser realizado em todas as pacientes com FNC clássica ou FNC leve, assim como em indivíduos do sexo feminino com hiperfenilalaninemia não-FNC, a partir da menarca, e que não estejam em período periconcepcional ou gestando.

Crítérios de exclusão para o uso de BH4: indivíduos do sexo masculino; mulheres grávidas que não foram avaliadas em relação ao seu perfil de responsividade a esse medicamento.

Crítério de responsividade: redução de FAL plasmática maior ou igual a 30% após 8 ou 24 horas a partir da ingestão do dicloridrato de sapropterina em relação ao ponto basal no dia dois, subtraindo a variação de FAL plasmática apresentada no primeiro dia do teste.



**Figura 5.** Modelo de logística para teste de responsividade ao BH4 no protocolo C – PCDT-CONITEC (2019).

Para avaliar a responsividade o seguinte exemplo será utilizado: uma paciente realiza o teste e apresenta os seguintes valores de FAL plasmática:

P0 – dia 1: 9 mg/dL;

P1 – dia 1: 10 mg/dL;

P0 – dia 2: 8 mg/dL;

P1 – dia 2: 7 mg/dL;

P2 – dia 2: 4 mg/dL.

O cálculo para a responsividade de 8 horas será:

$$[(P1_{dia2} - P0_{dia2}/P0_{dia2} \times 100) - (P1_{dia1} - P0_{dia1}/P0_{dia1} \times 100)]$$

$$[(7 - 8 \text{ mg/dL} = - 12,5\%) - (10 - 9 \text{ mg/dL} = 11,1\%)] = [- 12,5\% - (11,1\%)] = - 23,6 \%$$

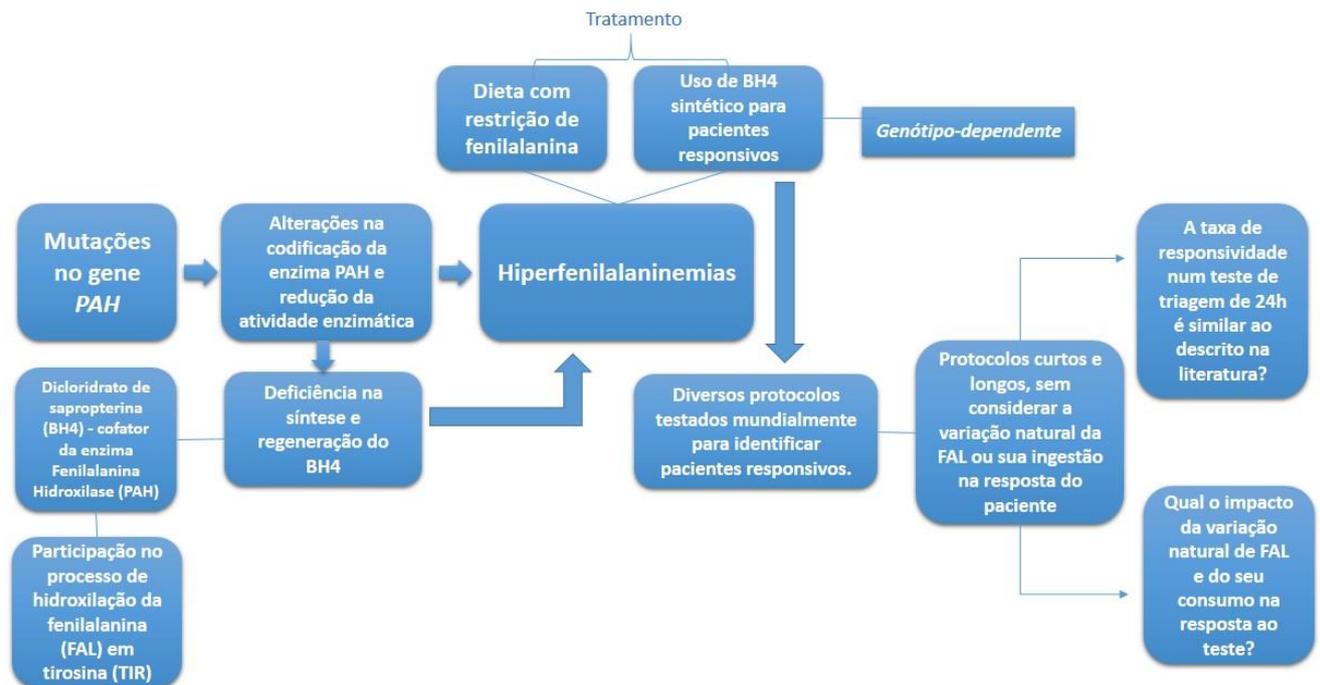
Para a responsividade de 24 horas, o seguinte cálculo é utilizado:

$$[(P2_{dia2} - P0_{dia2}/P0_{dia2} \times 100) - (P2_{dia1} - P0_{dia1}/P0_{dia1} \times 100)]$$

$$[(8 \text{ mg/dL} - 4 \text{ mg/dl} = - 50\%) - (9 \text{ mg/dL} - 8 \text{ mg/dL} = -11,1\%)] = [- 50\% - (-11,1\%)] = - 38,9\%$$

### 3. MARCO CONCEITUAL

Pacientes com hiperfenilalaninemia/FNC necessitam de uma dieta restrita por toda a vida devido às consequências decorrentes dos altos níveis de FAL acumulados no sangue e no Sistema Nervoso Central (SNC). Uma terapia que vem sendo estudada há décadas é a reposição da tetrahydrobiopterina (BH4), que mostrou ser capaz de reduzir os níveis de FAL em pacientes responsivos, apesar das divergências entre autores sobre qual o melhor protocolo. Por conta da variabilidade genética e fenotípica destes pacientes, para o uso do BH4 é necessário, antes de tudo, identificar aqueles pacientes que são responsivos ou não. Dentre essas variedades, questiona-se se um protocolo curto de 24h identifica a mesma taxa de responsividade que os descritos na literatura, e qual seria o impacto da variação natural de FAL e do seu consumo nos dias do teste nos resultados.



**Figura 6.** Marco conceitual.

PAH: fenilalanina-hidroxilase; BH4: tetrahydrobiopterina/dicloridrato de sapropterina; FAL: fenilalanina; TIR:tirosina

#### 4. JUSTIFICATIVA

O principal tratamento para a FNC é a dieta com baixo teor de FAL e novos tratamentos vêm sendo estudados a fim de proporcionar maior controle metabólico e consequente qualidade de vida a esses pacientes. O uso da tetraidrobiopterina (BH4) sintética (dicloridrato de sapropterina) vem sendo testada como um tratamento coadjuvante e diferentes protocolos foram desenvolvidos a fim de detectar pacientes responsivos.

Detectar diferenças nestes testes pode auxiliar no desenvolvimento de protocolos únicos e que consigam identificar maior número de pacientes responsivos que vão se beneficiar do tratamento e que tenha bom custo-benefício para pacientes e serviços de saúde.

Em sua maioria, os protocolos avaliam a resposta ao BH4 após 48h da sua ingestão, considerando o percentual de variação de FAL plasmática entre o ponto anterior ao BH4 e os pontos de coleta seguintes, seja 4h, 8h, 12h, 16h, 24h, 48h, etc. Devido a carência de estudos que controlem as variáveis de consumo de FAL e sua flutuação natural, este protocolo preconiza avaliar se a taxa de responsividade ao BH4 em 8h e 24h (teste de triagem curto) em pacientes com FNC é semelhante ao encontrado na literatura se considerarmos a flutuação natural de FAL plasmática para definir a responsividade, assim como avaliar se o consumo de FAL interfere nos resultados.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 PRIMÁRIO

Avaliar a taxa de responsividade ao dicloridrato de sapropterina (BH4) de pacientes com FNC em um teste de triagem de 24h (curto) considerando a influência da variação natural de FAL e do seu consumo nas respostas dos pacientes.

### 5.2 SECUNDÁRIOS

- a) Descrever a taxa de responsividade de acordo com o tipo de PKU (clássica ou leve);
- b) Verificar a concordância de responsividade dos pacientes comparando os genótipos com os resultados descritos no banco de dados BioPKU;
- c) Comparar a proporção de responsividade por ponto de hora com o descrito na literatura;
- d) Analisar o impacto da variação da ingestão dietética de FAL e da flutuação natural de FAL na resposta ao teste.

## 6. REFERÊNCIAS

Anikster Y, Haack TB, Vilboux T, Pode-Shakked B, Thony B, Shen N, et al. Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability. *Am J Hum Genet.* 2017;100(2):257-66.

Blau N, Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2004 Jun;82(2):101-111. DOI: 10.1016/j.ymgme.2004.03.006.

Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet.* 2010 Oct 23;376(9750):1417-27. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60961-0. PMID: 20971365.

Bodamer OA. Overview of phenylketonuria. Waltham, MA: UpToDate Inc.; 2010 [acesso em 18 fev 2019]. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-phenylketonuria>

Camargo Neto, E. Breve história da fenilcetonúria e do começo da prevenção do retardo mental. Porto Alegre: Ed. do Autor, 2015.

Evans, S., Ford, S., Adam, S. *et al.* Development of national consensus statements on food labelling interpretation and protein allocation in a low phenylalanine diet for PKU. *Orphanet J Rare Dis* **14**, 2 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0950-z>

Feillet F, van Spronsen FJ, MacDonald A, et al. Challenges and pitfalls in the management of phenylketonuria. *Pediatrics.* 2010 Aug;126(2):333-341. DOI: 10.1542/peds.2009-3584.

Flydal MI, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB Life.* 2013;65(4):341-349. doi:10.1002/iub.1150

Gambol PJ. Maternal phenylketonuria syndrome and case management implications. *J Pediatr Nurs.* 2007;22(2):129-138. doi:10.1016/j.pedn.2006.08.002

GIUGLIANI, Luciana et al . Responsividade à tetraidrobiopterina em pacientes com deficiência de fenilalanina hidroxilase. **J. Pediatr. (Rio J.)**, Porto Alegre , v. 87, n. 3, p. 245-251, jun. 2011 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0021-75572011000300011&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572011000300011&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 06 jun. 2020. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572011000300011>.

Gomes, KCMS Leandro, AP; Pinto, F. Novas abordagens para o tratamento da fenilcetonúria: avaliação em modelos celulares de formulações da fenilcetonúria hidroxilase humana – Dissertação de mestrado. Universidade de Lisboa, departamento de química e bioquímica, 2016. Disponível em <[https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/26534/1/ulfc120723\\_tm\\_K%C3%A1tia\\_Gomes.pdf](https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/26534/1/ulfc120723_tm_K%C3%A1tia_Gomes.pdf)>.

Gunduz M, Arslan N, Unal O, Cakar S, Kuyum P, Bulbul SF. Depression and anxiety among parents of phenylketonuria children. *Neurosciences (Riyadh)*. 2015 Oct;20(4):350-6. doi: 10.17712/nsj.2015.4.20150319. PMID: 26492114; PMCID: PMC4727619.

Interim Clinical Commissioning Policy: Sapropterin for phenylketonuria (all ages) [200805P] (URN 1840) First published: December 2018 Updated: November 2020 Version number: 3.0

J.L. Dhont, H. Ogier, J.F. Benoist, C. Belhesme, M. Giraud, The interpretation of tetrahydrobiopterin loading test in hyperphenylalaninemia, *J. Inherit. Metab. Dis.* 26 (Suppl. 2) (2003) 18.

Kalkanoglu HS, Ahring KK, Sertkaya D, Moller LB, Romstad A, Mikkelsen I, et al. Behavioural effects of phenylalanine-free amino acid tablet supplementation in intellectually disabled adults with untreated phenylketonuria. *Acta Paediatr.* 2005;94(9):1218-22.

Kure S, Hou DC, Ohura T, et al. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J Pediatr.* 1999;135(3):375-378. doi:10.1016/s0022-3476(99)70138-1

Leão, Leticia & Aguiar, Marcos. (2008). Newborn screening: What pediatricians should know. *Jornal de pediatria.* 84. S80-90. 10.2223/JPED.1790.

Lichter-Konecki U, Vockley J. Phenylketonuria: Current Treatments and Future Developments. *Drugs.* 2019;79(5):495-500. doi:10.1007/s40265-019-01079-z

Liu N, Huang Q, Li Q, et al. Spectrum of PAH gene variants among a population of Han Chinese patients with phenylketonuria from northern China [published correction appears in *BMC Med Genet.* 2018 Jan 9;19(1):6]. *BMC Med Genet.* 2017;18(1):108. Published 2017 Oct 5. doi:10.1186/s12881-017-0467-7

Marqui, Alessandra Bernadete Trovó. Fenilcetonúria: aspectos genéticos, diagnóstico e tratamento. *Rev Soc Bras Clin Med.* 2017 out-dez;15(4):282-8.

MIRA, Nádia VM de; MARQUEZ, Ursula M Lanfer. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 86-96, Feb. 2000. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102000000100016&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102000000100016&lng=en&nrm=iso)>. access on 06 June 2020. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102000000100016>.

Moradi, Parastoo & Sari Sarraf, Behrouz & Khamnian, Zhila & Dolatkah, Roya & Hadi, Soraya & Ghafari, Dorna & Dastgiri, Saeed. (2016). Distribution Occurrence of Phenylketonuria in the World: A Systematic Review and Meta-Analysis. <http://dohweb.tbzmed.ac.ir>. 6. 1-12.

Muntau AC, Adams DJ, Bélanger-Quintana A, Bushueva TV, Cerone R, Chien YH, Chiesa A, Coşkun T, de Las Heras J, Feillet F, Katz R, Lagler F, Piazzon F, Rohr F, van Spronsen FJ, Vargas P, Wilcox G, Bhattacharya K. International best practice for the evaluation of responsiveness to sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2019 May;127(1):1-11. doi: 10.1016/j.ymgme.2019.04.004. Epub 2019 Apr 26. PMID: 31103398.

Muntau AC, Roschinger W, Habich M, Demmelmair H, Hoffmann B, Sommerhoff CP, e cols.. Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N Engl J Med.* 2002;347(26):2122-32.

Nalin T, Schweigert Perry ID, Sitta A, Vargas CR, Saraiva-Pereira ML, Giugliani R, e cols.. Optimized loading test to evaluate responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH4) in Brazilian patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2011;104:S80-S5.

Pardridge WM. Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res.* 1998;23(5):635-644. doi:10.1023/a:1022482604276  
 PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS FENILCETONÚRIA, Ministério da Saúde, 2019.

Relatório de recomendação - Sapropterina para o tratamento da fenilcetonúria. Ministério da Saúde, 2018.

Strisciuglio P, Concolino D. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites.* 2014;4(4):1007-1017. Published 2014 Nov 4. doi:10.3390/metabo4041007

Triagem neonatal biológica – Manual técnico, 2016 - <  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem\\_neonatal\\_biologica\\_manual\\_tecnico.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/triagem_neonatal_biologica_manual_tecnico.pdf)>

Vallian S, Barahimi E, Moeini H. Phenylketonuria in Iranian population: a study in institutions for mentally retarded in IsPAHAN. *Mutat Res.* 2003;526(1-2):45-52. doi:10.1016/s0027-5107(03)00015-0

van Spronsen FJ, de Groot MJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ, van Rijn M. Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(6):671-676. doi:10.1007/s10545-010-9216-1

van Wegberg, A., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A. M., Burlina, A., Campistol, J., Feillet, F., Gizewska, M., Huijbregts, S. C., Kearney, S., Leuzzi, V., Maillot, F., Muntau, A. C., van Rijn, M., Trefz, F., Walter, J. H., & van Spronsen, F. J. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet journal of rare diseases*, 12(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0685-2>

Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline [published correction appears in *Genet Med.* 2014 Apr;16(4):356]. *Genet Med.* 2014;16(2):188-200. doi:10.1038/gim.2013.157

Yudkoff M. Phenylalanine Metabolism: Phenylketonuria. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28101/>

Zurflüh MR, Giovannini M, Fiori L, et al. Screening for tetrahydrobiopterin deficiencies using dried blood spots on filter paper. *Mol Genet Metab*. 2005; 86 Suppl 1:S96-S103. doi:10.1016/j.ymgme.2005.09.011

Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, et al. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Hum Mutat*. 2008;29(1):167-175. doi:10.1002/humu.20637

## 7. Artigo

O artigo aqui apresentado está em elaboração e será submetido ao Jornal de Pediatria da Sociedade Brasileira de Pediatria.

### **Avaliação da responsividade ao dicloridrato de sapropterina (BH4) em pacientes com fenilcetonúria segundo teste de triagem de 24h**

Ana J. B. Nunes<sup>1</sup>, Lisiane da Gama L<sup>1</sup>, Soraia Poloni<sup>3</sup>, Lilia F. Refosco<sup>3</sup>, Tássia Tonon<sup>2</sup>, Vaneisse Monteiro<sup>4</sup>, Rafael H. Tresbach<sup>4</sup>, Fernanda S. Ludwig<sup>4</sup>, Ida V. D. Schwartz<sup>1,2,4,5</sup>

1. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-Brasil
2. Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-Brasil
3. Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-Brasil
4. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-Brasil
5. Nuclimed – Centro de Pesquisas Clínicas. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre-Brasil

Correspondência:

Ida Vanessa Doederlein Schwartz

Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: +5551 3359-8011

E-mail: ischwartz@hcpa.edu.br

## Resumo

Pacientes com fenilcetonúria (FNC) e com atividade residual da enzima fenilalanina-hidroxilase (PAH) podem se beneficiar da administração do dicloridrato de sapropterina (BH4) caso sejam responsivos. **Objetivo:** Descrever a responsividade ao BH4 em pacientes com FNC de acordo com um protocolo de triagem de 24h e avaliar influência da flutuação natural e da variação do consumo de fenilalanina (FAL) na resposta dos pacientes. **Métodos:** Estudo retrospectivo, baseado em revisão de prontuário. Incluídos pacientes com FNC de um centro de referência e que realizaram o protocolo de triagem de responsividade de 24h. O paciente foi considerado responsivo se apresentasse uma redução >30% nos níveis de FAL em 8h e/ou 24h após a ingestão de 20mg/kg de BH4, considerando a variação natural de FAL plasmática do dia 1. Pacientes com redução entre 28-30% na FAL eram considerados responsivos caso tivesse genótipo concordante. **Resultados:** Doze dos 15 pacientes puderam ter os testes analisados, tendo um paciente resposta *bordeline* mas sem possibilidade de avaliar a concordância do genótipo e teve o teste inconclusivo. A mediana de flutuação natural de FAL foi de 5,9% (IQ25-75 -15,8:16,8). Quatro pacientes com FNC leve (33,3%) foram responsivos, sendo três responsivos em 8h e 24h (redução de FAL plasmática= -75,9±20,2% em 8h e -75,7±37,0% em 24h) e um em 8h (redução de FAL plasmática de -28,7%). A mediana (IQ25-75) de FAL pré e pós BH4 nos responsivos foi, respectivamente, 316,5µmol/L (235,2-613,9) e 187,27µmol/L (121,7-459,8), e, nos não responsivos, de 435,0µmol/L (383,9 - 632,0) e 399,5µmol/L (348,1-548,3), respectivamente (p= 0,257 e p=0,136). **Conclusão:** O teste de triagem de 24h com correção para a variação natural de FAL identifica uma taxa de pacientes com FNC leve responsivos similar ao descrito na literatura. O consumo de FAL deve ser controlado de forma objetiva nos dias do teste para evitar vieses na determinação da responsividade.

**Palavras-chave:** fenilcetonúria; responsividade; BH4; tetrahidrobiopterina

## Abstract

Patients with phenylketonuria (PKU) with residual activity of phenylalanine-hydroxylase enzyme (PAH) can benefit from sapropterin dihydrochloride (BH4) if they are responsive. **Objective:** To describe BH4 responsiveness in PKU patients according to a 24-hour screening protocol and to assess the natural fluctuation and variation in phenylalanine (Phe) consumption in patients' response. **Methods:** Retrospective study based on medical records review. PKU patients of a reference center who underwent the 24-hour response screening protocol were included. Patients were considered responsive if they had a >30% reduction in Phe levels at 8h and/or 24h after 20mg/kg BH4 ingestion, considering the natural range of Phe plasma on day 1. Patients with Phe reduction between 28-30% were considered responsive if the genotype was concordant. **Results:** Twelve of the 15 patients could have the test analyzed and one borderline patient without possibility to access the genotype was considered inconclusive. The median of Phe natural fluctuation was 5.9% (IQ25-75 -15.8:16.8). Four mild PKU patients (33.3%) were responsive, being three responsive at 8h and 24h (Phe plasma reduction =  $-75.9 \pm 20.2\%$  at 8h and  $-75.7 \pm 37.0\%$  at 24h) and one in 8h (Phe plasma reduction -28.7%). The Phe median (IR 25-75) before and after BH4 in responsives was, respectively,  $316.5 \mu\text{mol/L}$  (235.2-613.9) and  $187.27 \mu\text{mol/L}$  (121.7-459.8), and in non-responsives was  $435.0 \mu\text{mol/L}$  (383.9-632.0) and  $399.5 \mu\text{mol/L}$  (348.1-548.3), respectively ( $p=0.257$  e  $p=0.136$ ). **Conclusion:** The 24-hour screening test with correction for the Phe natural range identifies a rate of responsive patients with mild PKU similar to that described in the literature. Phe consumption should be objectively controlled on test days to avoid bias in determining responsiveness.

**Keywords:** phenylketonuria; responsiveness; BH4; tetrahydrobiopterin

## Introdução

A fenilcetonúria (FNC) é uma doença autossômica recessiva, causada por variantes patogênicas no gene *PAH*, que codifica a enzima hepática fenilalanina-hidroxilase (PAH). A ausência ou atividade deficiente dessa enzima impede a hidroxilação e conversão de fenilalanina (FAL) em tirosina (TIR), sendo essa reação dependente do cofator tetrahydrobiopterina (BH4). O acúmulo de FAL no organismo leva à neurotoxicidade com danos irreversíveis, e que só pode ser evitada se for precocemente diagnosticada e tratada <sup>[1]</sup>.

O tratamento da FNC deve ser mantido por toda a vida<sup>[2,3]</sup> e consiste em restrição de FAL na dieta, que deve ser totalmente isenta de alimentos de origem animal (com exceção de lactentes que podem receber leite materno em quantidade controlada e com orientação do nutricionista), e restrita em alimentos de origem vegetal que contenham alto teor de fenilalanina, combinada com uma fórmula metabólica isenta deste aminoácido. Com a interrupção do tratamento há risco de prejuízo ao desempenho cognitivo e comportamental<sup>[4,5]</sup>, comprometimento psiquiátrico como depressão, e complicações neurológicas como tremores, espasticidade, ataxia e epilepsia desde a infância<sup>[6]</sup>. O uso do BH4 na forma de dicloridrato de sapropterina é uma terapia aprovada<sup>[5,7]</sup> e supõe-se que ele atua como chaperona farmacológica, fazendo com que o paciente responsivo tenha maior tolerância à FAL e consiga ter um mais de liberdade e adesão à dieta<sup>[8-10]</sup>

No Brasil, as mulheres com FNC clássica, leve ou com hiperfenilalaninemia não-FNC em idade fértil ou em período periconcepcional/gestante são prioridades para o uso do BH4 devido ao risco de embriopatia por FAL ou síndrome de FNC materna<sup>[11,12]</sup>. Para o uso da medicação, o paciente deve ser submetido a um teste de responsividade ao BH4 e ser considerado responsivo de acordo com protocolo vigente no país. Pacientes com hiperfenilalaninemia ou FNC leve são os mais responsivos à terapia<sup>[13]</sup>.

Diversos protocolos para administração do BH4 têm sido estudados e, a melhor maneira de identificar a responsividade dos pacientes, assim como o que considerar como responsivo, ainda é motivo de debate entre os especialistas<sup>[8,13]</sup>. A flutuação natural de FAL e a variação da ingestão de FAL nos dias de teste são variáveis pouco exploradas nos protocolos e seu real impacto não está bem estabelecido. No Brasil, desde 2019, o Ministério da Saúde (MS) recomenda um protocolo de teste curto de 24h, feito em ambulatório e sem necessidade de internação, em que a flutuação natural de FAL é levada em consideração<sup>[5]</sup>. O objetivo

deste estudo é descrever a responsividade de pacientes com FNC submetidos ao teste curto de 24h e avaliar influência da flutuação natural e da variação do consumo de FAL na resposta dos pacientes.

## **Metodologia**

Estudo retrospectivo, com base em revisão de prontuário.

### *População*

Incluídos pacientes de ambos os sexos, com idade  $\geq 4$  anos, vinculados a um centro de referência em EIM onde este protocolo é utilizado de forma assistencial, e que realizaram o teste de acordo com o Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para FNC de 2019 [5]. De acordo com este PCDT, os níveis de FAL plasmática devem ser  $\geq 3\text{mg/dL}$  para a realização do teste.

### *Logística dos testes*

Foi realizado um teste ambulatorial de três dias, sendo 24h após a ingestão do BH4. No dia 1 (D1) foi avaliada a flutuação natural de FAL plasmática com coleta de sangue pela manhã no ponto basal (Ponto 0, D1) às 7h30 ou 8h, e após 8h (Ponto 1, D1). No dia 2 (D2) foi realizada coleta de sangue no ponto basal às 7h30 ou 8h (Ponto 2, D1 ou Ponto 0, D2), seguida por ingestão de 20mg/kg de BH4 em dose única, diluídos em água ou em suco de maçã industrializado. Novas coletas foram realizadas em 8h (Ponto 1, D2) e 24h (Ponto 2, D2) após o BH4. Em todas as coletas da manhã os pacientes estavam em jejum de 8h e nas coletas da tarde estavam em jejum de 1h. A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) foi o método laboratorial utilizado para mensurar a FAL plasmática.

### *Responsividade ao BH4*

Dois critérios foram estabelecidos para definir a responsividade, sendo que ambos consideram o percentual de variação natural de FAL avaliado no D1.

Critério 1 - redução de FAL  $\geq 30\%$  em 8h após a ingestão do BH4 levando em consideração o percentual de flutuação natural do D1; e/ou

Critério 2 - redução de FAL  $\geq 30\%$  em 24h após a ingestão do BH4 levando em consideração o percentual de flutuação natural do D1.

O cálculo para avaliar a responsividade é realizado considerando o percentual de variação de FAL em 8h e 24h após ingestão do BH4, a partir do ponto 0 do D2 (P0D2 ou P2D1), subtraindo o percentual de variação do D1.

Cálculo utilizado para avaliar a responsividade em 8h e 24h, conforme PCDT 2019:

8h:  $[(P1dia2 - P0dia2/P0dia2 \times 100) - (P1dia1 - P0dia1/P0dia1 \times 100)]$

24h:  $[(P2dia2 - P0dia2/P0dia2 \times 100) - (P2dia1 - P0dia1/P0dia1 \times 100)]$

Onde: P0dia1 = primeira coleta do D1; P1dia1 = segunda coleta do D1; P2dia1 ou P0dia2 = primeira coleta do D2, prévia ao BH4; P1dia2 = segunda coleta do D2, 8h após o BH4; P2dia2 = coleta única no terceiro dia do teste (D3), 24h após o BH4.

Pacientes com redução entre 28-30% em 8h e/ou 24h foram considerados responsivos *borderline* na presença de genótipo concordante, e o teste foi considerado não confiável/inválido se o paciente fosse não-aderente ao teste ao não consumir toda a medicação e/ou tivesse uma variação no consumo de FAL  $>30\%$  entre os dias do teste. Pacientes responsivos *borderline* que não pudessem ter a concordância com o genótipo analisada tiveram o teste considerado inconclusivo. Caso o paciente apresentasse uma boa resposta ao BH4 mesmo com um consumo de FAL  $\geq 30\%$  em relação ao dia anterior, o critério de responsividade segundo o genótipo foi utilizado (conforme descrito abaixo na seção “*concordância de responsividade*”). O fenótipo também foi levado em consideração.

#### *Consumo alimentar*

Os pacientes foram orientados a manter a dieta usual com restrição de FAL e uso de fórmula metabólica conforme prescrição do nutricionista assistente para evitar a oscilação no consumo de FAL. A adesão à dieta foi avaliada por registro alimentar nos 3 dias de teste e por fotos das refeições enviadas pelos responsáveis. No dia anterior ao início do teste (dia 0 ou D0), o registro alimentar foi iniciado através de um formulário padronizado. O consumo de FAL, calorias e proteínas foi calculado através do *software* Nutribase<sup>TM</sup> (NB16Cloud, Cybersoft Inc. Phoenix, AZ, USA) que tem como padrão a tabela de alimentos da USDA.

### *Genótipos*

Os dados relativos aos genótipos foram obtidos através de revisão de prontuários ou dos dados publicados no trabalho de Tresbach e colaboradores (2020) <sup>[14]</sup>.

### *Determinação do fenótipo*

O tipo de FNC foi classificado de acordo com o nível de FAL plasmática ao diagnóstico (sem tratamento) e/ou conforme tolerância do paciente ao longo dos anos de acompanhamento ao manejo da dieta, conforme descrito por Nalin e colaboradores (2010) <sup>[15]</sup> (modificado). Pontos de corte ao diagnóstico <sup>[5]</sup>: FAL >20 mg/dL = FNC clássica; FAL entre 6 e 20 mg/dL = FNC leve; FAL entre 2 e 6 mg/dL = hiperfenilalaninemia não FNC.

### *Concordância de responsividade*

A concordância de responsividade ao BH4 com a literatura foi avaliada comparando o genótipo do paciente com as informações contidas no BioPKU *database* (<http://www.biopku.org>) <sup>[16]</sup> para aquele genótipo. Foram considerados concordantes os pacientes cujo genótipo possuía registro de mais de 5 testados e a sua maioria (>50%) tivesse a mesma resposta.

### *Tolerância à fenilalanina*

A tolerância à FAL foi determinada previamente aos testes, em consultas ambulatoriais periódicas, através da progressão e avaliação da quantidade de FAL que cada paciente conseguia ingerir através de alimentos de origem vegetal, mantendo os níveis de FAL plasmática abaixo de 6mg/dL (<360 µmol/L).

### *Análises estatísticas e considerações éticas*

Os dados foram compilados em uma planilha do *software* da Microsoft Excel<sup>®</sup> 2013 e analisados estatisticamente com o *software Statistical Package for Social Sciences* versão 21.0 (SPSS<sup>®</sup> Inc, Chicago, IL). As variáveis contínuas com distribuição simétrica foram descritas como média e desvio-padrão e as variáveis assimétricas foram descritas como mediana e intervalo interquartil. As variáveis categóricas foram descritas como número absoluto e relativo (%) e comparadas pelo teste exato de Fischer. As variáveis contínuas com

distribuição simétrica foram comparadas pelo teste t de Student e as assimétricas pelo teste de Mann-Whitney. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação entre variáveis contínuas não-paramétricas. A normalidade das variáveis foi avaliada através do teste de Kolmogorov-Smirnov e o nível de significância ( $1 - \alpha$ ) foi de 95%.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CAEE 35624720.5.0000.5327).

## Resultados

Foram incluídos 15 pacientes de famílias não relacionadas, com mediana de idade de 8 anos (intervalo interquartil de 7-10 anos), 10 do sexo feminino (66,7%); 7 pacientes com FNC clássica (46,7%) e 8 com FNC leve (53,3%), sem diferença estatisticamente significativa nessas variáveis entre responsivos e não responsivos ( $p= 0,471$ ,  $p= 0,559$ ,  $p= 0,103$ , respectivamente). Três crianças não foram incluídas nas análises por não serem aderentes ao protocolo: um paciente com FNC clássica não conseguiu tomar toda a medicação e dois (FNC leve: 1; FNC clássica: 1) tiveram uma variação no consumo de FAL  $>30\%$  entre os dias de teste. Os dados sobre variação natural de FAL, consumo de FAL nos dias do teste e FAL plasmática pré e pós BH4 dos pacientes incluídos nas análises estão demonstrados na figura 1.

### 1) Responsividade

Dos 12 pacientes que tiveram o teste validado, 4 pacientes (33,3%) foram responsivos, todos com FNC leve, e um paciente com FNC leve (número 12, tabela 1) apresentou resposta *borderline* com redução de FAL plasmática de -29,1% em 8h e teve o teste inconclusivo devido impossibilidade de avaliar a concordância com o genótipo, conforme tabela 1. Três pacientes (1, 2 e 5, tabela 1) foram responsivos em 8h e 24h (redução de FAL plasmática de  $-75,9 \pm 20,2\%$  em 8h e  $-75,7 \pm 37,0\%$  em 24h) e um paciente (número 3, tabela 1) foi responsivo apenas em 8h, com redução de FAL plasmática de -28,7%, considerado responsivo *borderline* após análise do genótipo. Os valores de FAL plasmática e porcentagem de redução por ponto de hora após o BH4 de cada paciente incluído nas análises estão descritos na tabela 1. Dentre os pacientes analisados, 66,7% (4/6) dos pacientes com FNC leve foram responsivos e dos 5 com FNC clássica, nenhum foi responsivo.

## 2) *Consumo de fenilalanina*

Em relação ao consumo de FAL nos dias do teste, a mediana de variação entre os dias D0 e D1 foi de 0% (IQ25-75 -6,6:1,0%), e igualmente 0% (IQ25-75 -0,3:12,2%) entre D1 e D2. Essa variação no consumo entre os dias 0 e 1 não mostrou ter correlação com os níveis de FAL nos pontos 1, 2 e 3 pré-BH4 ( $p= 0,760$ ;  $p= 0,679$ ;  $p= 0,788$ , respectivamente), e a variação de consumo entre os dias 1 e 2 também não mostrou ter correlação com a FAL plasmática dos pontos 4 e 5 ( $p= 0,413$  e  $p=0,733$ , respectivamente).

## 3) *Concordância de responsividade*

Conforme descrito na tabela 1, todos os participantes tinham o genótipo disponível, e todos os nove pacientes (100%) que puderam ter a concordância avaliada foram concordantes com o descrito no BioPKU<sup>(15)</sup>. O paciente 8 ainda não possui registros do teste no BioPKU, e os genótipos do paciente 7 (c.[754C>T];[1222C>T] e 12 (c.[1042C>G];[1066-11G>A]) possuíam apenas 4 pacientes testados em cada, não sendo possível classificar a concordância pelo número de testados. Caso não considerássemos a flutuação natural de FAL, a concordância seria de 66,7% (6/9 pacientes).

## 4) *Flutuação natural de fenilalanina*

A mediana de flutuação natural de FAL foi de 5,9% (IQ25-75 -15,8:16,8), 26,1% (IQ25-75 -0,8:34,1) em responsivos e -2,6% (IQ25-75 -22,5:10,4) em não responsivos, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,059$ ), conforme figura 1. Cada paciente teve seus resultados analisados considerando a flutuação natural de FAL (conforme o protocolo) e sem considerá-lo (apenas analisando a variação após 8h e 24h da ingestão do BH4). Caso não considerássemos a variação natural neste protocolo, deixaríamos de identificar 1 paciente com FNC leve responsivo, conforme tabela 1.

## 5) *Eventos adversos*

Um paciente adulto apresentou dispepsia após a ingestão do BH4, teve o teste interrompido mas pôde ter a responsividade avaliada em 8h (não-responsivo).

## Discussão

Este estudo teve como objetivo principal descrever, através de um protocolo de triagem de 24h (curto), a identificação de pacientes com FNC responsivos ao BH4 e avaliar a interferência da flutuação natural de FAL e o seu consumo nos dias do teste nos níveis de FAL plasmática. A taxa de responsividade encontrada neste estudo foi semelhante ao encontrado na literatura<sup>[8,17-19]</sup> e a concordância da predição de responsividade segundo o genótipo entre os que puderam ser comparados com os dados do BioPKU supera com os 71% encontrados por Wettstein e colaboradores (2015) em estudo com 4181 pacientes com FNC<sup>[19]</sup>.

Com este protocolo, conseguimos identificar os pacientes com FNC leve responsivos em ambos critérios e apenas um responsivo *bordeline* em 8h, o que está de acordo com a literatura<sup>[8,17,18,20,21]</sup>, uma vez que pacientes com FNC leve têm melhor resposta ao BH4. Um estudo publicado em 2011 por Anjema K. e colaboradores<sup>[20]</sup> demonstrou que 16% dos pacientes poderiam ser perdidos ao não avaliar a resposta ao BH4 em 48h, porém, neste protocolo o BH4 foi administrado 2 vezes com intervalo de 24h entre as doses de 20mg/kg. Em um artigo publicado por um painel de experts<sup>[22]</sup>, os autores recomendam que seja realizado um protocolo de 48h em pacientes com níveis de FAL plasmática dentro do alvo, podendo chegar a 4 semanas em pacientes que forem responsivos neste teste, e o objetivo destes testes com duração  $\geq 48h$  seria a identificação de responsivos tardios. Uma vez que os protocolos testados e publicados encontram uma taxa de responsividade de aproximada entre 30 e 50%, principalmente em paciente com FNC leve, este teste de triagem de 24h identificou uma taxa de responsividade semelhante ao da literatura e também os pacientes que respondem mais rápido (dentro de 24h), sem o ônus de ser um teste prolongado passível de erros e de desconforto ao paciente e cuidadores. Os pacientes que demonstraram tendência em reduzir os níveis de FAL entre 8h e 24h, podem confirmar a responsividade em um teste prolongado, que pode variar de 4 semanas a 6 meses<sup>[20,22]</sup>.

Diferente de outros protocolos de responsividade, este teste curto considera os níveis de variação natural de fenilalanina, enquanto os demais utilizam apenas a diferença entre os valores de FAL plasmática pré e pós BH4. O uso da flutuação natural de FAL parece aumentar a precisão do teste e, sendo um teste curto e com maior precisão, torna-o mais custo-efetivo do que o teste longo, principalmente ao ser implementado a nível nacional por

sistemas de saúde. Nesta amostra de pacientes, se não considerássemos a variação natural, a taxa de responsividade seria de 41,6% (5/12). Aplicando esses cálculos para um protocolo similar que foi conduzido por Giugliani e colaboradores (2011)<sup>[8]</sup> no mesmo serviço mas que não considerou a variação natural de FAL, teríamos encontrado mais 3 pacientes responsivos (um em ambos critérios, um no critério 1 e um no critério 2), enquanto perderíamos outros dois que foram responsivos, um em ambos critérios e outro critério 2, mas não seriam se levassem a flutuação natural em conta. Não foram encontradas características que possam justificar essa discordância.

Nos estudos anteriores realizados no mesmo serviço<sup>[8, 21]</sup>, os pacientes possuíam idade maior ou igual a 4 ou 7 anos, este último devido maior capacidade de cooperação com o teste. No atual protocolo, 5 pacientes tinham entre 4 e 7 anos, sendo que dois pacientes de 7 e 8 anos apresentaram dificuldade para ingerir a medicação, e os demais foram colaborativos.

O consumo de FAL é uma variável pouco controlada nos estudos e acreditamos que uma variação muito grande no consumo pode alterar os resultados do teste. Adotamos o valor empírico de 30% como limite para variação e deve ser levado em consideração principalmente se for uma redução em  $\geq 30\%$  no consumo, em especial entre D1 e D2, onde o BH4 é ingerido. O limite de variação de 30% adotado no nosso protocolo se mostrou adequada visto que, pela análise estatística, não interferiu no resultado do teste.

Um dos diferenciais do nosso estudo foi o controle do consumo de FAL através de registro alimentar com alimentos pesados (em sua maioria) e o registro por fotos, o que permitiu uma baixa variação do consumo entre os dias, não impactando nos níveis plasmáticos de FAL. Outros protocolos<sup>[17,18,20]</sup> não citam se foi feito ou como foi feito o controle sobre essa importante variável. Um ponto a ser ressaltado é que devido os pacientes serem de outras cidades, para alguns, o ambiente em que são habituados a comer foi trocado por restaurantes, o que levou a maior ingestão de alimentos no geral, como foi o caso de um dos pacientes excluídos, que teve o consumo maior no primeiro dia do teste e reduziu (em relação ao D0) no dia em que tomou o BH4, tendo uma diferença de mais de 90% entre os dias 0 e 1 e de -35% entre os dias 2 e 3. Mesmo orientando os pacientes a não alterarem sua dieta habitual, chega-se à conclusão de que mesmo mantendo os alimentos habituais, as quantidades e o padrão de consumo são alterados conforme o ambiente, o que pode levar a uma variação nos níveis de FAL não percebidos pelos cuidadores. Devido a isso, sugere-se

que os responsáveis sejam orientados a terem um cardápio padrão controlado nos três dias, para evitar a invalidação e futura repetição do teste. Ainda, fotografar as refeições (de preferência antes e depois do consumido) auxilia na avaliação, e o registro alimentar deve ser avaliado junto com o responsável para confirmar quantidades, modo de preparo, quantidade consumida e possíveis alimentos/guloseimas que passam despercebidos pela família. Sugerimos fortemente que os alimentos sejam pesados em balança própria para tal.

Em relação a efeitos adversos, tivemos uma taxa de 6,7%, considerada dentro do esperado conforme bula da medicação.

Comparado a outros estudos aqui citados, o tamanho amostral pode ser considerado uma das limitações, principalmente pelas perdas ocorridas na amostra. Além disso, o teste curto não possibilita a identificação de responsivos tardios (>48h após a ingestão do BH4), em sua maioria pacientes com FNC clássica. Outra limitação encontrada foi a limitação geográfica. Apesar de os pacientes serem de outras cidades, nenhum demonstrou resistência para se deslocar e realizar o teste, porém, a troca de ambiente pode ter afetado o consumo habitual, levando à exclusão de dois pacientes das análises. A idade pode também ser fator limitante, porém, não seria motivo para excluir possíveis candidatos, principalmente entre 4 e 10 anos, pois as crianças podem ser colaborativas se os pais tiverem um diálogo aberto sobre o teste. Diluir a medicação em suco de maçã industrializado pode amenizar o sabor dela e auxiliar na adesão das crianças.

## **Conclusões**

Este teste de triagem de 24h (curto) com correção para a variação natural de FAL pôde identificar uma taxa de pacientes com FNC leve responsivos similar ao descrito na literatura. A correção pela variação natural de FAL parece identificar mais pacientes responsivos, mas novos estudos com este enfoque e com um maior número amostral devem ser realizados. O consumo de FAL deve ser controlado de forma objetiva nos dias do teste para evitar vieses na determinação da responsividade.

## **Agradecimentos**

Ao laboratório Biomarin Inc® pelo fornecimento do dicloridrato de sapropterina (BH4) para a realização dos testes.

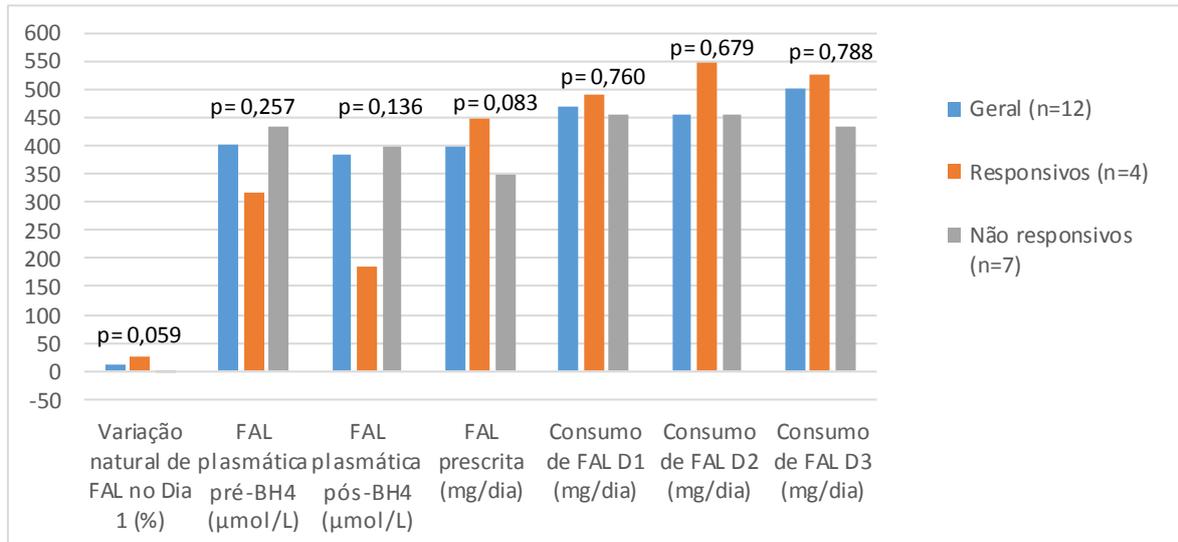
## Referências

1. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet*. 2010 Oct 23;376(9750):1417-27. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60961-0. PMID: 20971365.
2. van Wegberg, A., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A. M., Burlina, A., Campistol, J., Feillet, F., Gizewska, M., Huijbregts, S. C., Kearney, S., Leuzzi, V., Maillot, F., Muntau, A. C., van Rijn, M., Trefz, F., Walter, J. H., & van Spronsen, F. J. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet journal of rare diseases*, 12(1), 162.
3. Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline [published correction appears in *Genet Med*. 2014 Apr;16(4):356]. *Genet Med*. 2014;16(2):188-200. doi:10.1038/gim.2013.157
4. MIRA, Nádia VM de; MARQUEZ, Ursula M Lanfer. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev. Saúde Pública, São Paulo* , v. 34, n. 1, p. 86-96, Feb. 2000 .
5. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS FENILCETONÚRIA, Ministério da Saúde, 2019.
6. Kalkanoglu HS, Ahring KK, Sertkaya D, Moller LB, Romstad A, Mikkelsen I, et al. Behavioural effects of phenylalanine-free amino acid tablet supplementation in intellectually disabled adults with untreated phenylketonuria. *Acta Paediatr*. 2005;94(9):1218-22.
7. Sapropterina para o tratamento da fenilcetonúria. Ministério da Saúde, 2018.
8. GIUGLIANI, Luciana et al . Responsividade à tetraidrobiopterina em pacientes com deficiência de fenilalanina hidroxilase. *J. Pediatr. (Rio J.)*, Porto Alegre , v. 87, n. 3, p. 245-251, jun. 2011.

9. Gunduz M, Arslan N, Unal O, Cakar S, Kuyum P, Bulbul SF. Depression and anxiety among parents of phenylketonuria children. *Neurosciences (Riyadh)*. 2015 Oct;20(4):350-6. doi: 10.17712/nsj.2015.4.20150319. PMID: 26492114; PMCID: PMC4727619.
10. Marqui, Alessandra Bernadete Trovó. Fenilcetonúria: aspectos genéticos, diagnóstico e tratamento. *Rev Soc Bras Clin Med*. 2017 out-dez;15(4):282-8.
11. Bodamer OA. Overview of phenylketonuria. Waltham, MA: UpToDate Inc.; 2010
12. Gambol PJ. Maternal phenylketonuria syndrome and case management implications. *J Pediatr Nurs*. 2007;22(2):129-138. doi:10.1016/j.pedn.2006.08.002
13. Blau N, Erlandsen H. The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004 Jun;82(2):101-111. DOI: 10.1016/j.ymgme.2004.03.006.
14. Tresbach RH, Sperb-Ludwig F, Ligabue-Braun R, et al. Phenylketonuria Diagnosis by Massive Parallel Sequencing and Genotype-Phenotype Association in Brazilian Patients. *Genes (Basel)*. 2020;12(1):20. Published 2020 Dec 25. doi:10.3390/genes12010020
15. Nalin, T.; Perry, IDS.; Refosco, LF.; Netto, CBO.; de Souza, CFM.; Vieira, TA.; Picon, PA.; Schwartz, IVD. Fenilcetonúria no sistema único de saúde: avaliação de adesão ao tratamento em um centro de atendimento do rio grande do sul. *Rev HCPA* 2010;30(3):225-232
16. BIOPKU: Database of Phenotypes and Genotypes causing Phenylalanine Hydroxylase Deficiency (PKU) incl. BH4-responsive HPA/PKU. Disponível em <<http://www.biopku.org/biopku/search-start.asp>>
17. Pérez-Dueñas, B., Vilaseca, M. A., Mas, A., Lambruschini, N., Artuch, R., Gómez, L., Campistol, J. Tetrahydrobiopterin responsiveness in patients with phenylketonuria. *Clinical Biochemistry*, 2004. 37(12), 1083–1090. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.09

18. Matalon, R., Michals-Matalon, K., Koch, R., Grady, J., Tying, S., & Stevens, R. C. (2005). Response of patients with phenylketonuria in the US to tetrahydrobiopterin. *Molecular Genetics and Metabolism*, 86, 17–21. doi:10.1016/j.ymgme.2005.06.024
19. S. Wettstein, J. Underhaug, B. Perez, B.D. Marsden, W.W. Yue, A. Martinez, et al., Linking genotypes database with locus-specific database and genotype-phenotype correlation in phenylketonuria, *Eur. J. Hum. Genet.* 23 (2015) 302) 302
20. Anjema, K., Venema, G., Hofstede, F. C., Carbasius Weber, E. C., Bosch, A. M., Ter Horst, N. M., ... van Spronsen, F. J. (2011). The 48-hour tetrahydrobiopterin loading test in patients with phenylketonuria: Evaluation of protocol and influence of baseline phenylalanine concentration. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104, S60–S63. doi:10.1016/j.ymgme.2011.09.024
21. Nalin T, Perry ID, Sitta A, Vargas CR, Saraiva-Pereira ML, Giugliani R, Blau N, Schwartz IV. Optimized loading test to evaluate responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH4) in Brazilian patients with phenylalanine hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2011;104 Suppl:S80-5. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.09.019. Epub 2011 Sep 20. PMID: 22014474.
22. Muntau AC, Adams DJ, Bélanger-Quintana A, Bushueva TV, Cerone R, Chien YH, Chiesa A, Coşkun T, de Las Heras J, Feillet F, Katz R, Lagler F, Piazzon F, Rohr F, van Spronsen FJ, Vargas P, Wilcox G, Bhattacharya K. International best practice for the evaluation of responsiveness to sapropterin

### Lista de figuras e tabelas



**Figura 1** – Variação natural de FAL no dia 1, FAL plasmática pré e pós BH4 e consumo de FAL durante o teste dos 12 pacientes incluídos nas análises. Um paciente teve o teste inconclusivo e não foi incluído nos grupos responsivos/não responsivos. FAL = Fenilalanina; BH4 = dicloridrato de sapropterina; D1 = Dia 1; D2 = dia 2; D3 = dia 3

**Tabela 1** - Níveis plasmáticos de fenilalanina e percentual de redução após ingestão de 20mg/kg de BH4 com e sem a correção para a flutuação natural de fenilalanina em pacientes com fenilcetonúria

Paciente	Tipo PKU	Sexo	Idade (anos)	Genótipo Alelo 1/ Alelo 2	Responsividade segundo genótipo	FAL Pré-BH4 (µmol/L)			FAL Pós-BH4 (µmol/L)		% de variação da FAL pós-BH4 com correção variação natural*		Responsividade com correção variação natural*		% de variação da FAL pós-BH4 sem correção variação natural**		Responsividade sem correção variação natural**	
						P0 D1	P1 D1 (8h)	P2 D1 (24h)/P0 D2	P1 D2 (8h)	P2 D2 (24h)	8h	24h	8h	24h	8h	24h	8h	24h
1	Leve	F	8	c. 1066-11G>A/ c. 1169A>G	100% (8/8)	297,3	354,0	488,1	231,0	236,5	-71,7	-115,7	R	R	-52,7	-51,5	R	R
2	Leve	F	7	c. 1169A>G/ c. 1222C>T	100% (25/25)	213,5	287,0	259,0	94,8	135,8	-97,8	-68,8	R	R	-63,4	-47,5	R	R
3	Leve	M	16	c. 194T>C/ c. 1241A>G	82% (9/11)	254,6	235,7	197,6	126,3	155,3	-28,7	-0,9	R	NR	-36,1	-21,4	R	NR
4	Clássica	F	10	c. 1042C>G/ c. 1315+1G>A	17% (1/6)	404,0	445,9	456,6	440,7	381,2	-13,8	-29,5	NR	NR	-3,5	-16,5	NR	NR
5	Leve	M	7	c. 194T>C/ c. 1222C>T	55% (11/20)	588,5	783,5	704,1	528,4	541,9	-58,1	-42,6	R	R	-24,9	-23,0	NR	NR
6	Clássica	F	13	c. 1222C>T/ c. 1222C>T	3% (3/98)	591,1	649,2	681,8	666,7	621,9	-12,0	-24,1	NR	NR	-2,2	-8,8	NR	NR
7	Clássica	F	9	c. 754C>T/ c. 1222C>T	0% (0/4)	303,1	335,2	340,0	329,7	427,7	-13,6	13,6	NR	NR	-3,0	25,8	NR	NR
8	Clássica	F	8	c. 712A>C/ c. 814G>T	ND (0/0)	457,4	372,1	322,5	344,2	432,0	25,4	63,4	NR	NR	6,7	33,9	NR	NR
9	Leve	F	4	c. 782G>A/ c. 1315+1G>A	7% (2/30)	523,9	510,0	568,1	509,4	523,3	-7,7	-16,3	NR	NR	-10,3	-7,9	NR	NR
10***	Leve	M	7	c. 473G>A/ c. 1162G>A	20% (1/5)	444,1	344,2	418,7	225,1	287,4	-23,7	-25,6	NR	NR	-46,2	-31,3	R	R
11***	Clássica	F	24	c. 782G>A/ c. 1315+1G>A	4% (1/25)	844,0	465,9	586,2	393,3	ND	11,9	ND	NR	ND	-32,9	ND	R	ND

12****	Leve	F	9	c. 1042C>G/ c.1066-11G>A	0% (0/4)	340,6	347,3	326,7	237,8	315,8	-29,1	0,7	Inconclusivo	NR	-27,2	-3,3	NR	NR
--------	------	---	---	-----------------------------	-------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-----	--------------	----	-------	------	----	----

FAL= fenilalanina; ND: Não Disponível; F= Sexo feminino; M= Sexo masculino; R= Responsivo; NR= Não Responsivo; POD1 = primeira coleta do dia; P1D1 = segunda coleta do dia 1; P2D1 ou P0D2 = primeira coleta do dia 2, prévia ao BH4; P1D2 = segunda coleta do dia 2, 8h após o BH4; P2D2 = coleta única no terceiro dia do teste (D3), 24h após o BH4.\*Segundo fórmula com correção pela variação natural de FAL do dia 1 (PCDT); \*\*Sem correção para a variação natural de FAL do dia 1; \*\*\*Pacientes cuja responsividade é discordante com o BioPKU se não considerar a variação natural de FAL do dia 1; \*\*\*\*Paciente com resposta *bordeline* considerado inconclusivo devido número de testados no BioPKU <5. Os pacientes 7, 8 e 12 possuíam menos de 5 testados no banco de dados BioPKU; O paciente 11 apresentou dispepsia e teve o teste interrompido; Os pacientes 1, 2, 4, 7, 8, 9 e 11 tiveram seu s genótipos descritos no trabalho de Tresbach e colaboradores <sup>(14)</sup>.

## 8. CONCLUSÕES

As conclusões serão apresentadas de acordo com cada objetivo específico proposto.

### a) Descrever a taxa de responsividade de acordo com o tipo de FNC (clássica ou leve)

A taxa de responsividade de acordo com o tipo de FNC encontrada neste protocolo foi 100% FNC leve (4/4), e nenhum paciente com FNC clássica foi responsivo. Dos três pacientes que não foram incluídos nas análises devido não adesão ao protocolo, apenas um tinha FNC clássica, e o paciente com resposta *bordeline* e com teste inconclusivo tinha FNC leve. Estes dados corroboram com a literatura, onde pacientes com hiperfenilalaninemia não-FNC e FNC leve têm maior frequência de responsividade.

### b) Verificar a concordância de responsividade dos pacientes comparando os genótipos com os resultados descritos no banco de dados BioPKU

Todos os pacientes incluídos no estudo possuíam genótipo completo disponível. Aqueles que puderam ter a concordância avaliada e comparada (9/9) tiveram resposta ao BH4 concordantes com o descrito no BioPKU caso considerássemos a flutuação natural de FAL, e 6/9 (66,7%) seriam concordantes se não considerássemos a flutuação natural de FAL. Esse achado reitera o papel do genótipo em prever a probabilidade do paciente em ser responsivo e mostra que a taxa de concordância é maior quando utilizada a flutuação natural de FAL do paciente. Apesar disso, o genótipo não impede que pacientes com genótipos com menor taxa de responsividade sejam testados para confirmar, uma vez que alguns genótipos ainda possuem menos de 5 pacientes testados no BioPKU.

### c) Comparar a proporção de responsividade por ponto de hora com o descrito na literatura

Este protocolo identificou 100% (4/4) dos pacientes responsivos em 8h após a ingestão do BH4, um responsivo *bordeline* em 8h e nenhum paciente responsivo em 24h isoladamente. Três (75%) dos quatro responsivos foram responsivos em ambos critérios. Entre os não responsivos (7/12= 58,3%), três pacientes (42,85%) tiveram aumento no percentual de resposta entre 8h e 24h, mas não chegaram a ser responsivos. Encontrar mais pacientes responsivos em 8h com este protocolo pode se justificar por: 1) os pacientes com fenótipo de

FNC leve são melhores respondedores e apresentam resposta de forma mais rápida e mais prolongada; 2) se não utilizássemos o critério de responsivos *bordeline* (resposta entre 28-30% juntamente com genótipo e o fenótipo para determinar a responsividade), o número de responsivos cairia de 4 para 3 dos 12 que tiveram o teste validado; 3) a meia-vida de 4h da medicação ter seu pico de efeito mais próximo de 8h do que de 24h.

**d) Analisar o impacto da variação da ingestão dietética de FAL e da flutuação natural de FAL na resposta ao teste**

Devido a variação no consumo de FAL >30% nos dias de teste ser um dos critérios para invalidá-lo, a amostra analisada possuía um bom controle da ingestão e apresentou baixa variação. Este limite adotado deve ser levado em consideração principalmente se for uma redução >30% no consumo, em especial entre os dias 1 e 2, onde o BH4 é ingerido. Em casos onde a ingestão de FAL é aumentada em mais de 30% e o paciente tiver resposta positiva ao BH4, o genótipo e o tipo de FNC devem ser analisados para avaliar a plausibilidade biológica do resultado. O limite de variação de 30% adotado neste protocolo se mostrou adequado visto que, pela análise estatística, não interferiu no resultado do teste, e variáveis individuais como o genótipo e o fenótipo devem ser avaliados, uma vez que a responsividade ao BH4 é multifatorial.

Diferente de outros protocolos de responsividade, este teste curto considera os níveis de variação natural de FAL, enquanto os demais utilizam apenas a diferença entre os valores de pré e pós BH4. Nesta amostra de pacientes, se não considerássemos a variação natural, a taxa de responsividade seria de 41,7% (5/12) *versus* 33,3% (4/12) considerando. A flutuação natural de FAL pode ser considerada pois, conforme aqui demonstrado, a FAL plasmática pode ser reduzida naturalmente e não apenas sob efeito do BH4, a depender do paciente. Além disso, considerar a variação natural de FAL parece aumentar a precisão do teste, tornando-o mais custo-efetivo do que o teste longo e também teve maior concordância com o descrito no BioPKU.

## 9. PERSPECTIVAS

Como discutido e explanado na revisão teórica desta dissertação e visto nos resultados, ainda não temos um protocolo único que possa ser usado de forma global para identificar pacientes com FNC responsivos ao BH4. Protocolos dos mais diversos tipos foram testados, em sua maioria com semelhante taxa de responsividade e pontos de hora avaliados, mas, devido tamanha diversidade de protocolos, genótipos, fenótipos, serviços de referência e realidade de cada país, existe uma dificuldade em identificar qual protocolo traria melhor custo benefício ao paciente e aos sistemas de saúde.

Protocolos longos (4 semanas a 6 meses) podem ser realizados para identificar pacientes tardios não identificados nos testes de triagem curtos de 24h ou 48h, porém, é inviável para sistemas de saúde públicos arcarem com tamanha demanda para todos os pacientes com FNC sem necessidade para tal. Além disso, em protocolos longos existe o desconforto das coletas de sangue aos quais os pacientes precisam se submeter e as maiores chances de erros quando prescrito sem recomendação. Por outro lado, os protocolos longos são mais fidedignos à rotina do paciente do que um teste curto controlado. Uma das perspectivas do grupo para os próximos estudos é comparar a responsividade entre testes longos e testes curtos como o apresentado aqui.

Como muitas dúvidas precisam ser sanadas, as perspectivas futuras são de que diferentes protocolos possam ser comparados e analisados a fim de aprimorar sua precisão e custo-benefício. Para o próximo ano, devido parceria com instituições de outros estados, será possível analisar dados de outros protocolos que são realizados de forma assistencial e que poderão ser divulgados e comparados, possibilitando também analisar a custo-efetividade de cada protocolo.

## 10. ANEXOS E APÊNDICES

### Apêndice 1 – Orientações para realização do teste de responsividade ao BH4

Teste de responsividade ao BH4			
Identificação			
Nome:		Prontuário:	
Data de Nascimento:		Idade:	
Peso:	Estatura: cm	IMC:	
Orientações			
<p>Prezado paciente/familiar, a realização do teste de responsividade tem como objetivo verificar se os níveis de fenilalanina melhoram com o uso do BH4.</p> <p>Para que o teste funcione, é fundamental que você <b>não mude sua dieta habitual</b> durante a realização do teste, ou seja, você deve se alimentar normalmente, com os mesmos alimentos que consome usualmente, inclusive usar a fórmula metabólica nas doses prescritas. Caso você não faça isso, os resultados podem dar errado.</p> <p>O teste será realizado em 3 (três) dias; nesse período, será utilizado o BH4 e serão realizadas coletas de sangue durante 3 (três) dias consecutivos. Neste informativo, será explicado todo o procedimento do teste de responsividade. É importante ressaltar que todas as coletas de sangue serão realizadas no térreo do Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA).</p> <p>Durante o teste, você estará acompanhado por Tássia Tonon e Ana Jaquelline Bernardo Nunes, e as dúvidas existentes poderão ser esclarecidas por elas, ou com a Dra Ida Schwartz.</p> <p>Para que o teste funcione, é fundamental que você não atrase, que todos os procedimentos/coletas sejam feitos no horário combinado. A sugestão é que se chegue sempre com antecedência de 15 minutos aos lugares marcados.</p> <p>Lembrando que, para o dia anterior ao início do teste e nos dias de coleta 1 e 2, você deverá preencher um registro alimentar e enviar fotos de tudo o que for consumido pelo paciente (enviar para o WhatsApp do número <a href="https://api.whatsapp.com/send?phone=51989610756">51 989610756</a>).</p> <p>Caso seja necessário realizar alguma alteração nas orientações que constam neste informativo, entraremos em contato com você.</p> <p><b>SE ESTIVER GRIPADO OU COM FEBRE EM ALGUM DOS DIAS PROGRAMADOS, NOS AVISE COM ANTECEDÊNCIA, POIS PROVAVELMENTE TEREMOS QUE REMARCAR AS DATAS DO TESTE.</b></p>			
Dia 1			
No primeiro dia, o paciente deve chegar as 6:45h da manhã, no térreo do Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), para a primeira coleta, e retornar as 15h para a segunda coleta. Estaremos esperando por você.			
XX/XX/XXXX	Horário: 7:00h	O paciente deve estar em jejum de pelo menos 8h (primeira coleta).	

		<p>Neste momento você deve entregar o registro alimentar do dia anterior.</p> <p>Logo após a coleta você poderá comer sua dieta, e não necessita permanecer no HCPA.</p>
	Horário: 15:00h	<p>O paciente deve estar em jejum prévio de 1h (segunda coleta).</p> <p>Logo após a coleta, poderá comer a dieta, e não necessita permanecer no HCPA.</p>
<b>Dia 2</b>		
<p>No segundo dia, o paciente deve chegar às 7:00h da manhã, no térreo do Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), para a primeira coleta, e retornar às 15h para a segunda coleta. Estaremos esperando por você.</p>		
XX/XX/XXXX	Horário: 7:00h	<p>O paciente deve estar em jejum de pelo menos 8h (primeira coleta).</p> <p>Logo após a coleta, o paciente tomará o BH4 (20 mg/kg/dia – XX mg = X comprimidos) diluído em água ou em suco de maçã industrializado. Este será o único momento do teste no qual será administrado o medicamento.</p> <p>Neste momento você deve entregar o registro alimentar do dia anterior.</p> <p>Em seguida, o paciente poderá comer sua dieta, e não necessita permanecer no HCPA.</p>
	Horário: 15:00h	<p>O paciente deve estar em jejum prévio de 1h (segunda coleta).</p> <p>Logo após a coleta você poderá comer sua dieta, e não necessita permanecer no HCPA.</p>
<b>Dia 3</b>		
<p>No terceiro dia, paciente deve chegar às 7:00h da manhã, no térreo do Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), para apenas uma coleta. Estaremos esperando por você.</p>		
XX/XX/XXXX	Horário: 7:00h	<p>O paciente deve estar em jejum de pelo menos 8h (única coleta).</p> <p>Neste momento você deve entregar o registro alimentar do dia anterior.</p> <p>Em seguida, o paciente poderá comer sua dieta, e não necessita permanecer no HCPA.</p>

Assim que os resultados estiverem prontos, nós avisaremos. Isto pode levar algum tempo, porém não mais que um mês.

## **Apêndice 2 - Formulário para registro alimentar de 3 dias**

### **REGISTRO ALIMENTAR – Teste de responsividade ao BH4**

#### **INSTRUÇÕES PARA O COMPLETO PREENCHIMENTO DO REGISTRO ALIMENTAR DE 3 DIAS:**

1. Anotar tudo o que foi ingerido no dia anterior ao início do teste, no dia 1 e dia 2.
2. As informações devem ser claras, registrar como o alimento foi preparado, por exemplo: cozido, frito, assado, ao vapor e quais os ingredientes foram usados na receita.
3. Registrar a quantidade ingerida dos alimentos, em medidas caseiras, por exemplo: colher de café, colher de chá, colher de sobremesa, colher de sopa, colher de servir, xícara ou copo, se possível medir em mililitros (ml) os líquidos.
4. Lembrar-se de escrever todos os condimentos, por exemplo: açúcar, margarina, óleo vegetal, tempero, bem como os alimentos ingeridos fora do horário das refeições.
5. Anotar sempre a quantidade de alimento que foi ingerida pelo paciente e não a quantidade servida.
6. Incluir rótulo e/ou nome da marca dos produtos industrializados ingeridos.
7. Enviar por whatsapp foto de tudo o que o paciente for comer no período do teste.
8. Se o paciente não faz alguma das refeições presentes no formulário, escrever “não faz” no campo.

***TODOS ESTES DADOS DEVEM SER PREENCHIDOS CORRETAMENTE, POIS SÃO MUITO IMPORTANTES PARA QUE O NUTRICIONISTA POSSA CALCULAR AS QUANTIDADES DE CALORIAS, PROTEÍNAS E DEMAIS NUTRIENTES INGERIDOS NA DIETA.***

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_ DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_  
 DATA: \_\_\_\_\_ PESO: \_\_\_\_\_ ALTURA/COMPRIMENTO: \_\_\_\_\_  
 FONE PARA CONTATO: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ RESPONSÁVEL: \_\_\_\_\_

<b>1º dia</b> Data: _____	<b>LOCAL</b>	<b>ALIMENTOS OFERECIDOS</b>	<b>QUANTIDADE INGERIDA</b> (colheres, copo, xícara ou mamadeiras)	<b>OBSERVAÇÕES</b>
<b>CAFÉ DA MANHÃ</b> Horário: _____ -				
<b>LANCHE DA MANHÃ</b> Horário: _____ -				
<b>ALMOÇO</b> Horário: _____ -				
<b>LANCHE DA TARDE</b> Horário: _____ -				
<b>JANTAR</b> Horário: _____ -				
<b>CEIA</b> Horário: _____ -				

APETITE:      POUCO ( )      NORMAL ( )      MUITO ( )

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_ DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_  
 DATA: \_\_\_\_\_ PESO: \_\_\_\_\_ ALTURA/COMPRIMENTO: \_\_\_\_\_  
 FONE PARA CONTATO: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ RESPONSÁVEL: \_\_\_\_\_

2º dia Data: _____	LOCAL	ALIMENTOS OFERECIDOS	QUANTIDADE INGERIDA (colheres, copo, xícara ou mamadeiras)	OBSERVAÇÕES
CAFÉ DA MANHÃ Horário: _____ -				
LANCHE DA MANHÃ Horário: _____ -				
ALMOÇO Horário: _____ -				
LANCHE DA TARDE Horário: _____ -				
JANTAR Horário: _____ -				
CEIA Horário: _____ -				

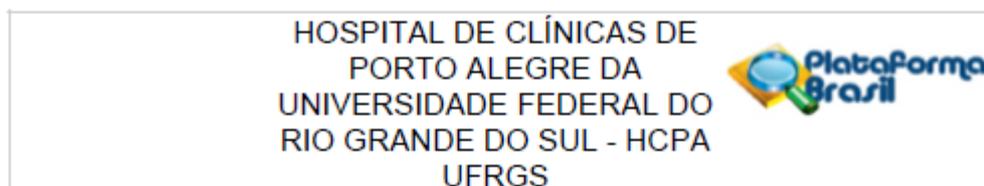
APETITE:      POUCO ( )      NORMAL ( )      MUITO ( )

NOME DO PACIENTE: _____	DATA DE NASCIMENTO: _____
DATA: _____	PESO: _____ ALTURA/COMPRIMENTO: _____
FONE PARA CONTATO: (____) _____	RESPONSÁVEL: _____

3º dia Data: _____	LOCAL	ALIMENTOS OFERECIDOS	QUANTIDADE INGERIDA (colheres, copo, xícara ou mamadeiras)	OBSERVAÇÕES
CAFÉ DA MANHÃ  Horário: _____ -				
LANCHE DA MANHÃ  Horário: _____ -				
ALMOÇO  Horário: _____ -				
LANCHE DA TARDE  Horário: _____ -				
JANTAR  Horário: _____ -				
CEIA  Horário: _____ -				

APETITE:      POUCO ( )      NORMAL ( )      MUITO ( )

## Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Comparação de três protocolos de avaliação à responsividade de tetraidrobiopterina (BH4) aplicados a pacientes com hiperfenilalaninemia no sul do Brasil

**Pesquisador:** Soraia Poloni

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 2

**CAAE:** 35624720.5.0000.5327

**Instituição Proponente:** HOSPITAL DE CLINICAS DE PORTO ALEGRE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.281.248

#### Apresentação do Projeto:

**Introdução:** A fenilcetonúria (FNC) é uma doença genética, autossômica recessiva, causada por mutações no gene PAH, que decodifica a enzima hepática fenilalanina-hidroxilase (PAH). A deficiência de PAH resulta no acúmulo do aminoácido fenilalanina (FAL) no sangue de indivíduos que têm essa deficiência, e foi um dos primeiros erros inatos do metabolismo (EIM) a ser diagnosticado através de triagem neonatal (VOCKLEY J, 2014). A ausência (ou atividade deficiente) dessa enzima impede a conversão de fenilalanina, um aminoácido essencial, em tirosina (PCDT, 2019). O acúmulo de FAL no organismo leva a uma neurotoxicidade com danos irreversíveis, e que só pode ser evitada se for precocemente diagnosticada e tratada. A doença pode ser identificada através do teste do pezinho e, quanto antes detectada e adequadamente tratada, menor será o dano causado (PCDT, 2019). **Objetivo:** Comparar três diferentes protocolos de responsividade ao BH4 que foram utilizados no Serviço de Genética Médica de um hospital terciário no sul do país, de forma retrospectiva. **Métodos:** A comparação entre os protocolos se dará através de análises estatísticas: a frequência de responsivos entre os grupos e a

Continuação do Parecer: 4.281.248

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 16 de Setembro de 2020

---

**Assinado por:**  
Têmis Maria Félix  
(Coordenador(a))

## Anexo 2 – Envio de resumos e pôsteres para congressos nacionais e internacionais

### SEMANA CIENTÍFICA DO HCPA

---

#### AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO DICLORIDRATO DE SAPROPTERINA (BH4) EM PACIENTES COM FENILCETONÚRIA SEGUNDO TESTE DE TRIAGEM DE 24H

CAEE: 20201000-48  
 Apoio financeiro: FIPE/HCPA  
 Biomarin Pharmaceutical Inc.

Ana Jaqueline Bernardo Nunes<sup>1</sup>, Lisiane da Gama<sup>1</sup>, Soraia Poloni<sup>3</sup>, Lília Farret Refosco<sup>3</sup>, Tássia Tonon<sup>2</sup>, Vaneisse Monteiro<sup>3</sup>, Rafael Hencke Tresbach<sup>4</sup>, Fernanda Sperb Ludwig<sup>4</sup>, Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>1,2,4</sup>  
 Contato: ana.jaqueline@gmail.com

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
2. Serviço de Genética Médica, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Brasil
3. Serviço de Nutrição e Dietética, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Brasil
4. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-Brasil

#### INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria (FNC) é um erro inato do metabolismo causado por mutações no gene *PAH*, que codifica a enzima hepática fenilalanina-hidroxilase (PAH), e que tem como cofator a tetraidrobiopterina (BH4). Em pacientes com atividade residual da PAH, a administração de BH4 pode atuar aumentando a atividade enzimática.

#### OBJETIVO

Descrever a responsividade ao BH4 em pacientes com FNC de acordo com um protocolo de triagem de 24h.

#### MÉTODOS

- Coorte prospectiva.
- Realizado teste ambulatorial de 3 dias em pacientes com FNC.
- Os pacientes foram mantidos em tratamento usual para FNC: dieta restrita em fenilalanina (FAL) + ingestão de fórmula metabólica.
- A aderência à dieta foi avaliada por registro alimentar no dia anterior ao teste e nos dias 1 e 2, uma vez que no terceiro dia é feita a coleta apenas no início da manhã.

A logística dos testes está apresentada na figura 1:

**Figura 1.** Logística para teste de responsividade ao BH4 em teste de triagem de 24h.

→ **Dia 1:** avaliada a flutuação natural dos níveis FAL no ponto basal (ponto 0, às 8h) e após 8h (ponto 1, às 16h)

→ **Dia 2:** coletado sangue no ponto basal antes da ingestão do BH4 (ponto 2, às 8h), seguido da ingestão de uma dose única de 20 mg/kg da medicação e nova coleta após 8h da ingestão do BH4 (ponto 3, às 16h)

→ **Dia 3:** realizada nova coleta dos níveis de FAL 24h após a ingestão do BH4 (ponto 4, às 8h).

**Critério de responsividade:**

- Redução de 30% de FAL sérica após 8h e/ou 24h da ingestão do BH4 em comparação à variação natural do dia 1.
- Casos *borderline* (redução entre 28-30%) foram considerados responsivos na dependência do genótipo concordante.
- A ingestão incorreta do medicamento; falhas nos pontos de coleta de FAL; ou uma redução >30% da ingestão de FAL entre o dia 2 e 1 do teste caracterizou o teste como inconclusivo.

#### RESULTADOS

	Geral	Responsivo n = 6	Não responsivo n = 7
Idade (anos) (n=15)	9,5±4,7	8,67±3,83	10
Sexo feminino (n=15)	10 (66,7%)	4 (66,7%)	5 (71,42%)
Fenótipo FNC			
FNC leve (n=8)	8 (53,4%)	5 (83,3%)	4 (57,14%)
FNC clássica (n=6)	6 (40%)	1 (16,7%)	3 (42,85%)
FNC indefinida (n=1)	1 (16,6%)	0	0
FAL pré-BH4 (mg/dl) (n=13)	6,82 (3,98 – 9,31)	6,21±2,74	7,91±2,05
FAL pós-BH4 (mg/dl) (n=13)	3,86 (2,11 – 7,81)	4,43±2,46	7,14±2,19
Consumo de FAL Dia 1 (mg/dia) (n=13)	450 (370 - 525)	595,58 (375 - 732,5)	450 (242 – 550)
Consumo de FAL Dia 2 (mg/dia) (n=13)	450 (380 - 565)	576,67 (357,5 – 757,5)	450 (400 – 550)
Consumo de FAL Dia 3 (mg/dia) (n=13)	500 (370 – 575)	611,73 (465 – 717,5)	420 (292 – 600)

**Tabela 1.** Características pré e pós BH4 dos 13 pacientes avaliados\*

Valores apresentados em mediana e intervalo interquartil ou valor bruto e percentual. \*O teste foi conduzido em 15 pacientes, porém, dois pacientes tiveram teste inconclusivo: um por não tomar toda a medicação (PKU indefinido) e um devido variação no consumo de FAL >30% (PKU leve), sendo excluídos das análises.

A mediana de flutuação natural de FAL foi de +10,58% (intervalo interquartil 7,22-26,19). Seis pacientes (46%) foram responsivos: 5/6 (83,3%) com PKU Leve (na figura 2, pacientes 1, 2, 3, 6, 8) e um (16,7%) com PKU clássica (paciente 13). A taxa de responsividade foi de 38,4% para PKU leve e 7,7% para PKU Clássica. Quatro pacientes (1, 2, 6 e 13) foram responsivos em 8h e 24h (-68,41±19,25% em 8h e -69,63±28,22% em 24h) e dois (3 e 8) foram responsivos *borderline* apenas em 8h (-28,91±0,25%) e a conclusão do teste foi determinada a partir da comparação da taxa de responsividade de cada genótipo pelo BioPKU (p.[Ile65Trh];[Tyr414Cys] e p.[Leu348Val];[?]).

**Figura 2.** Responsividade de pacientes com FNC ao BH4 em teste de triagem de 24h.

A concordância de predição de responsividade pelo genótipo segundo o BioPKU foi de 90%. Um paciente adulto apresentou dispepsia após a ingestão do BH4, teve o teste interrompido e foi não-responsivo em 8h.

#### CONCLUSÃO

Como esperado, a resposta ao BH4 foi maior em pacientes com PKU leve, estando a maioria de acordo com a predição do genótipo. A flutuação natural é um ponto a ser considerado, assim como a possibilidade de não colaboração da criança e baixíssima ocorrência de eventos adversos.



14<sup>TH</sup> INTERNATIONAL CONGRESS OF  
INBORN ERRORS OF METABOLISM

21-23 NOVEMBER 2021, SYDNEY, AUSTRALIA

## Screening of sapropterin dihydrochloride (BH4) responsiveness in PKU patients according to a 24h-protocol

Ida Vanessa Doederlein Schwartz<sup>1,2</sup>, Ana Jaquelline Bernardo Nunes<sup>1,2</sup>, Lisiane da Gama<sup>1,2</sup>, Soraia Poloni<sup>3,2</sup>, Lilia Farret Refosco<sup>3,2</sup>, Tassia Tonon<sup>1,2</sup>, Vaneisse Monteiro<sup>1,2</sup>, Rafael Hencke Tresbach<sup>1,2</sup>

1 Federal University of Rio Grande do Sul

2 Medical Genetics Service - Hospital de Clinicas de Porto Alegre

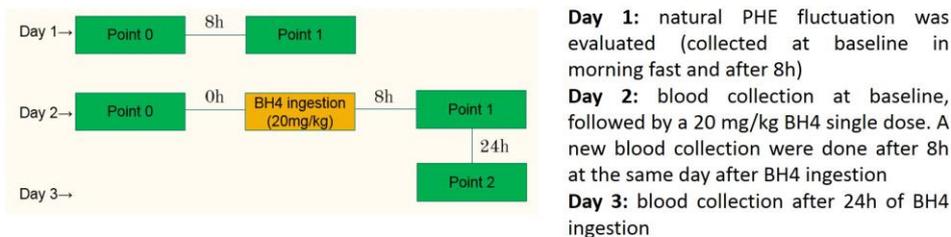
3 Nutrition and Dietetics Service - Hospital de Clinicas de Porto Alegre

**Introduction:** In patients with phenylketonuria (PKU) with residual activity of the enzyme phenylalanine-hydroxylase (PAH), tetrahydrobiopterin (BH4) administration can act increasing the enzymatic activity.

**Objective:** To describe the BH4 responsiveness in PKU patients according to a 24h-screening protocol.

**Methods:** Patients were instructed to maintain their usual phenylalanine (PHE) restricted diet, and their adherence was measured by daily food recalls.

**Figure 1.** BH4 responsiveness test logistics



**Responsiveness criteria:** blood Phe reduction at 8h and/or 24h post-BH4 load had to be at least 28-30% higher than that evaluated in day 1.

**Results:** Fifteen patients were included and two children had inconclusive results for not being adherent to the test. Six patients (46%) were responsive: 5/6 (83.3%) with mild PKU and one (16.7%) with classic PKU. Four patients were responsive in both 8h and 24h, and two patients were responsive only at 8h. The concordance of the prediction of responsiveness by genotype according to BioPKU database and by the test was 90%. One adult patient presented dyspepsia after taking the BH4. If natural fluctuation was not considered, 2 responsive patients would be considered nonresponsive and 1 nonresponsive would be responsive, all with mild PKU. Patients characteristics are described in table 1.

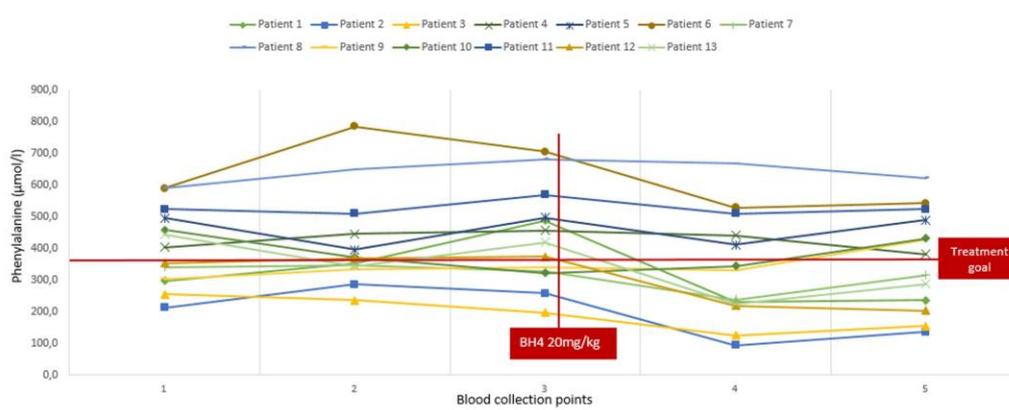


14<sup>TH</sup> INTERNATIONAL CONGRESS OF  
INBORN ERRORS OF METABOLISM  
21-23 NOVEMBER 2021, SYDNEY, AUSTRALIA

**Table 1.** Patients baseline characteristics

Characteristic (n=15)	
Age (years)	9.5±4.7
Female	10 (66.6%)
PKU phenotype	
Mild PKU	8 (53.3%)
Classic PKU	6 (40%)
Undefined PKU	1 (6.6 %)
PHE consumption (n=13)	
Day 1	500.42±299
Day 2	500.15±199.4
Day 3	514.62±239,31

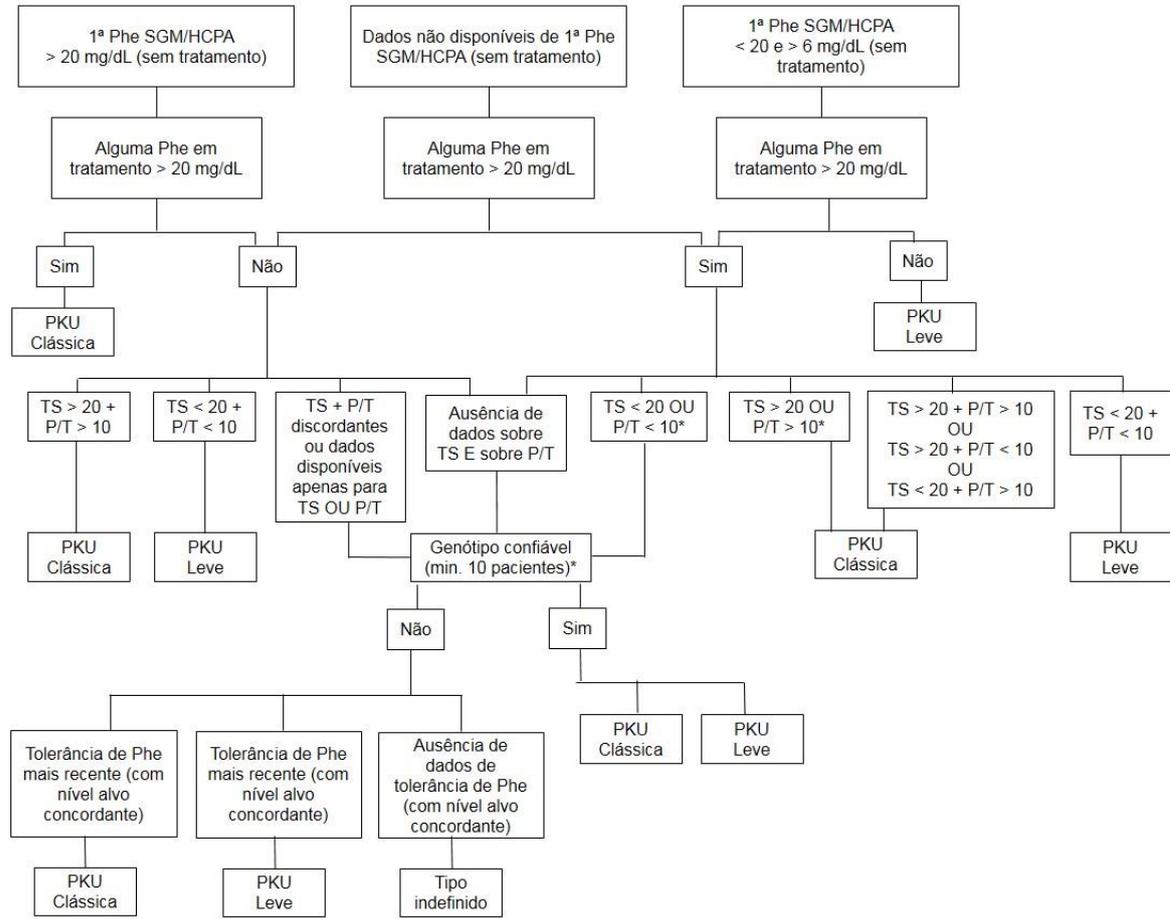
**Figure 2.** Individual PKU patients responsiveness according to a 24h screening protocol



**Conclusion:** As expected, the response to BH4 was higher in patients with mild PKU, being most in agreement with the genotype prediction. The natural fluctuation is a point to be considered, as well the occurrence of non-compliance in children and of very low frequency of adverse events

**Acknowledgements:** We thank the organization of the event that provided the exposure of this study, as well as the Research and Events Incentive Fund (FIPE) of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

### Anexo 3 – Fluxograma de classificação do tipo de hiperfenilalaninemia/FNC adotado pelo SGM-HCPA



<p><b>Tolerância de Phe:</b></p> <p>Leve &lt; 6m: &gt; 20 mg/kg/dia          Leve 6-12 meses: &gt; 35mg/kg/dia          Leve após 12 meses: &gt; 500 mg/dia</p> <p>Clássica até 6 meses: &lt; 20mg/kg/dia          Clássica 6-12 meses: &lt; 35 mg/kg/dia          Clássica após 12 meses: &lt; 500 mg/dia</p>	<p><b>TS – Teste de sobrecarga de Phe;</b>          P/T – razão Phe/Tyr na primeira medida SGM/HCPA sem tratamento;          * Genótipo confiável: considerar apenas os que não há discordância entre os tipos de PKU.</p> <p>Phe: 1mg/dL = 60,5 µMol/L          Tyr: 1mg/dL = 55,2 µMol/L</p>
--	--